

2. ウイルス第二部

部長 脇田隆字

概要

当部が対応するウイルスは主として消化器系疾患の原因ウイルスであり、A、B型肝炎ワクチン、経口生ポリオワクチンを検定、検査対象としてきたが、今年度はさらに、弱毒生ロタワクチンの承認前検査を実施し、さらに不活化ポリオワクチンの承認前検査も開始した。

第1室は下痢症ウイルスを担当するとともに、ポリオワクチン、ロタワクチンの検定、検査を担当する。本年度は経口生ポリオワクチンの中間バルク1件、小分製品1件の検定をおこなった。また、二種の経口生ロタワクチンの承認前検査が終了した。さらに、不活化ポリオワクチンの承認前検査が開始された。ワクチン導入前後のロタウイルスの流行状況を把握するための研究、ロタウイルスの基礎研究も開始している。

ノロウイルスに関しては、感染研はレファレンスセンターとしての機能を良く果たしている。カリシウイルスに関する基礎研究が進展している。X線解析、クライオ電顕による構造解析に関する研究が進んだ。

第2室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定を受けて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析を続けた。西太平洋地域では2000年以来ポリオフリーを維持してきたが、今年度は中国の新疆ウイグル自治区で野生型ポリオの流行が確認された。流行は終息したが今後も注視していく必要がある。JICAとの共催で実施した第21回ポリオ実験室診断技術研修会（ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術研修としては第2回目）ではポリオ流行国など各国からの参加者に講義および実習を実施した。また、国内エンテロレファレンスセンターとしてレファレンス活動、依頼検査をおこなった。

ポリオウイルスの基礎研究として、ウイルス複製に関わる新規宿主因子を同定した。今後の解析が期待される。また、エンテロウイルス71は手足口病の原因ウイルスであり、脳炎を

併発することがある。エンテロウイルス71の感染受容体、ヒトPSGL-1に関する解析を進めている。さらにエンテロウイルスに対する抗ウイルス化合物を複数同定し、その標的についての解析をおこなった。環境中のエンテロウイルスサーベイランスも進めている。

第3室及び第4室ではB型およびC型肝炎ウイルスの研究をおこなった。B型肝炎ウイルス産生細胞を用いた研究によりウイルスの生活環の各過程の解析を開始している。C型肝炎ウイルス研究では遺伝子型3などの新たなウイルス感染増殖モデル系の構築が進んだ。また、予防的ワクチン開発も進行している。肝炎研究基盤整備事業の3年度目となり、研究シンポジウムを開催した。肝炎ウイルス研究成果の情報収集・解析、研究者育成などを進めている。今年度は5回の研修会を実施した。

第5室の最重要課題はA型及びB型肝炎ワクチンの検定、検査である。本年度はA型肝炎ワクチン2件、B型肝炎ワクチン5件の検定をおこなった。

2011年には千葉県でA型肝炎が流行した。ウイルス遺伝子解析から日本に常在するウイルス株の流行と考えられた。またE型肝炎ウイルスの研究が進んだ。ウイルス培養系を利用したウイルス学的解析や、ワクチン開発、ラット・サルでのE型肝炎ウイルス解析を進めている。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

第二室

李 岩（中国、山東省疾病予防控制中心）＜笹川フェロー＞平成22年9月3日～平成23年8月23日、エンテロウイルスの遺伝子診断の研究

第五室

Sadaf Bashir Dar（University of Delhi）平成23年2月27日～平成23年5月18日、LAMP法によるB型肝炎ウイルス検出法の開発と応用とE型肝炎ウイルスの基礎研究

人事面では、平成 23 年 6 月に藤井克樹研究員が、同年 10 月にパク・ヤンビン研究員が採用された。さらに平成 24 年 3 月にフセイン・アリ主任研究員が採用された。新職員の皆さんの活躍に大いに期待する。平成 24 年 3 月に村山麻子研究員が退職された。

平成 23 年 9 月より岡智一郎主任研究官と政木隆博主任研究官が研究休職し、岡主任研究官は米国オハイオ州立大学の Linda Saif 教授の研究室に留学し、政木主任研究官は米国ノースカロライナ大学医学部感染症学教室、Stanley M. Lemon 教授の研究室に留学した。平成 24 年 4 月より西村順裕主任研究官も研究休職し、米国ペンシルバニア大学医学部附属フィラデルフィア小児病院（感染症部門）の Bergelson 教授研究室に留学予定である。留学した職員の皆さんの飛躍を期待する。

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス (NoV) に関する研究

(1) ノロウイルスリバースジェネティクスシステムに関する研究

新生ウイルス粒子を産生可能なヒトノロウイルス GII/3 U201 株の完全長 cDNA pKS-U201F を用いたリバースジェネティクスシステムを GII/4 Saga1 strain, GII/4_3 キメラウイルス株 TCH04-577 株, GI/1 Norwalk prototype virus に応用するため, U201 と同様なコンストラクションを行い, それぞれのクローンの細胞内挙動を live cell imaging, 共焦点レーザー顕微鏡 でコンボリューション蛍光顕微鏡によって確認するとともに, 粒子形成の確認を行った。

[片山和彦, 岡智一郎, 村上耕介, 戸高玲子, 脇田隆宇]

(2) ノロウイルス (NoV) のゲノム解析

2010 年 4 月～2011 年 3 月の間に全国 20 カ所の衛生研究所で収集した感染者糞便を用い, NoV 遺伝子型 GII/4 のゲノム全長の塩基配列を得た。少なくとも 7 種の GII/4 の単系統亜株が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた。ゲノムの変異集積部位は, 構造タンパク質領域の P ドメインに限らず, 非構造タンパク質領域にも認められることが明らかになった。得られた情報は, ノロウイルスサーベランスに還元した。

[本村和嗣, 横山 勝, 中村浩美, 守 宏美, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析研究センター), 岡智一郎, 片山和彦]

(3) ノロウイルス GII の組織血液型抗原物質 (HBGA) の結合を阻害する低分子化合物の X 線構造解析による研究

ノロウイルス (NoV) VLP 表面に突出する P 領域には, 様々なタイプの HBGA が結合することが報告されている。P 領域を大腸菌で発現し, 高度に生成した後, 低分子化合物と混合して結晶を作成し, X 線結晶構造解析を行った。P 領域の α 1-2fucose 結合領域にクエン酸が競合して結合可能であることが明らかになった。 α 1-2fucose は, 腸管粘膜上のムチンに大量に存在していることが知られている。クエン酸もしくは, それと同様の骨格を持つ低分子は, NoV 粒子の α 1-2fucose 結合部位を塞ぐことで, 腸管粘膜へのウイルス粒子のコンタクトを阻害する可能性がある。

[Grant S Hansman, Ivelin Georgiev (NIH), Jason S McLellan (NIH), Lei Chen (NIH), Tongqing Zhou (NIH), Kazuhiko Katayama and Peter D Kwong (NIH)]

(4) X 線結晶構造解析を用いた全ての GII ノロウイルスに結合するモノクローナル抗体 5B18 の結合様式の研究

ノロウイルス VLP を免疫して作出されたモノクローナル抗体 (MoAb) 5B-18 は, 全ての GII ノロウイルス (NoV) VLP に結合可能であり, VLP 上に存在する共通のエピトープを認識している可能性がある。そこで, 5B-18 とノロウイルス GII の P 領域を共結晶化し, X 線構造解析を行った。また, クライオ電子顕微鏡による VLP の構造解析も行った。MoAb 5B-18 は, P 領域の下部に結合しており, 3 次構造上に直列に並んだアミノ酸残基と結合していた。ノロウイルス GII のクライオ電子顕微鏡による構造解析の結果, GII の P 領域は, GI に比べ粒子のシェル部分から高く立ち上がっており, 抗体が P 領域下部から結合可能な十分なスペースを持つことが確認された。

[Hansman, GS, Taylor DW (エール大学), McLellan JS, Smith TJ, Georgiev, Tame JR (NIH), Park SY (横浜市立大学), Yamazaki M, Gondaira F, Miki M (デンカ生研), Katayama K, Murata K (岡崎統合バイオサイエンスセンター), Kwong PD (NIH)]

(5) ノロウイルス網羅的全ゲノム塩基配列解析と CaliciWeb の構築

ノロウイルス (NoV) は, 構造タンパク質領域のゲノム塩基配列を用いて, GI から GV の 5 つのグループに分類できる。このうち, 人に感染するのは GI, II, IV である。GI, GII にはそれぞれ遺伝的に異なる 14-17 種類以上の genotype が存在している。これら genotype のうち, 全長塩基配列が明らかになっているのは約 60%に過ぎない。我々は, 全長塩基配列の明らかになっていない genotype の網羅的全ゲノム塩基配列解析を推進し, ノロウイルスの分子進化機構, 流行のメカニズム解明を推進している。さらに, NoV を含むカリシウイルスデータベース, 情報共有サイト CaliciWeb の構築し, 国内外への塩基配列データ共有化を進めている。本年度は, 12 種類の genotype の全塩基配列を決定した。

[天野加奈子, 小沢一弘, 三木元博, 片山和彦, 岡智一郎, 村上耕介, 三瀬寛台 (札幌医大), 戸高玲子, 脇田隆宇]

(6) ヒトノロウイルス VLP のヒト腸管由来培養細胞への結合様式の解析

ヒトノロウイルス (HuNoV) の細胞への結合を明らかにするため、ヒト腸上皮様細胞株 Caco-2 に HuNoV VLP を加えた後、抗 VLP 抗体を使用して細胞表面の VLP を共焦点レーザー顕微鏡で検出した。その結果、VLP が一部の細胞集団に特異的に結合することを明らかにした。また、Caco-2 を分化させると、VLP 結合細胞の割合が増加することを明らかにした。このことから、Caco-2 の分化に伴い発現が亢進する分子が HuNoV の結合に関与していることが予想された。

[村上耕介, 戸高玲子, 岡智一郎, 松田 幹 (名大院生命農学), 片山和彦]

(7) ノロウイルス, サポウイルス網羅的 VLP および抗体の作製

ノロウイルス (NoV), サポウイルス (SaV) は、感染モデル動物も存在せず、培養細胞で増殖させることもできない。これらのウイルスの研究、抗原抗体検出システムの開発などにウイルス様中空粒子 (VLP) と、それを用いて作製する抗血清は、研究用ツールとして極めて有用である。当部室では、VLP と抗血清の作製を継続し、パネルを維持している。本年度は、4 種類の新たな VLP, 抗血清を作製した。

[天野功奈子, 小沢一弘, 三木元博, 片山和彦, 岡智一郎, 村上耕介, 李天成, 朴 英斌, 戸高玲子, 脇田隆宇]

(8) ノロウイルス食中毒事例調査のためのシーケンスデータ共有化

ノロウイルス (NoV) の広域食中毒事例の早期探知に有効と考えられるシーケンスデータの共有化を実施し、全国のノロウイルス, サポウイルスによる食中毒事例を探知した。その結果、昨年度から今年度にかけて GII.4 の流行は全報告例の約 60% に減少し、GII.2, GII.3 の流行拡大の傾向が検出された。

[野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部), 片山和彦, 岡智一郎, 山下和予 (感染症情報センター), ノロウイルスリサーチグループジャパン]

(9) 電子顕微鏡観察を用いたノロウイルス不活化評価方法の研究

ノロウイルス VLP をモデルに、各種不活化剤候補 (エタノール, 次亜塩素酸ナトリウム, 界面活性剤) による粒子崩壊を電子顕微鏡で観察し、画像による不活化評価を行った。さらに、感染性マウスノロウイルス: MuNoV, ネコカリシウイルス: FCV を用いて、同様の検討を行った。VLP は、次亜塩素酸ナトリウム処理, 界面活性剤処理により、効果的な崩壊が認められた。また pH 変化による粒子変形と崩壊が起きることが明らかになった。この現象は感染性粒子 (MuNoV, FCV) においても観察された。崩壊が観察された感染性粒子は、明らかな感染力価の低下を認めた。電子顕微鏡による粒子形状の崩壊の評価は、ノロウイルス, FCV の不活化を予測に有用である。[佐藤 惇 (花王), 三木元博, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 岡智一郎, 村上耕介, 片岡紀代 (感染病理), 片山和彦]

(10) マウスノロウイルス (MuNoV) の細胞内局在

ノロウイルスの複製機構を明らかにするため Raw264.7 培養細胞で増殖する MuNoV 蛋白質, ゲノム dsRNA (複製中間体二本鎖 RNA), nsRNA (新規合成された RNA) の細胞内局在を、蛍光顕微鏡を用いて調べた。複製に必須のポリメラーゼは、核膜部位に N-terminal protein, VPg, dsRNA と、ウイルス粒子主構成成分 VP1 は主に細胞膜部位に nsRNA と共局在した。MuNoV の複製は核膜部位, 粒子形成は細胞膜で起こり、それぞれに関与する RNA 種が示唆された。

[下池貴志, 高木弘隆 (バイオセーフティ), 岡智一郎, 村上耕介, 脇田隆宇, 片山和彦]

(11) マウスノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作製の試み

マウスノロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの作製を目指し、pKS-U201F のヒトノロウイルス遺伝子領域をマウスノロウイルスと交換した pKSF-MuNoV-S7, マウスノロウイルスゲノム RNA を T7 RNA polymerase promoter で転写可能な pT7-MuNoV-S7 を構築した。インビトロで合成した MuNoV RNA は、感染性 MuNoV 粒子を産生可能であった。トランスポゾンによるスクランを行った結果、ORF1 領域に外来性シーケンスを挿入可能な領域を見いだした。

[中西 章 (国立長寿医療研究センター), 片山和彦, 村上耕介, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 戸高玲子, 脇田隆宇]

(12) 新規マウスノロウイルス(MNV)の分離とアルコール、ポピドンヨードによる不活性化

実験室飼育マウスノロウイルス糞便より RAW 細胞を用いて MuNoV を分離培養して、全塩基配列を決定したところ、遠矢らによって分離された S7 株とは遺伝的に異なるクラスターに属する株であった。本 MuNoV 株を RAW 細胞で増殖させ、アルコール、ポピドンヨードによる不活性化試験を行った。MuNoV は、アルコールに感受性であり、50%以上のアルコール濃度で効果的に不活化可能であった。ポピドンヨードに対しても高い感受性を示した。新規分離株と S7 の両薬剤に対する感受性に差はなかった。MuNoV は、これまでヒトノロウイルスのモデルとして用いられてきた FCV に比べ、アルコールが不活化に有効であることが示された。

[村上省一 (明治製菓), 高村弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日大), 岡智一郎, 北島正章, 片山和彦]

(13) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼによる 3C/3D 切断へのアミノ酸置換の効果

ノロウイルス Chiba407 株 (GI/4) の 3C/3D 切断部位に種々のアミノ酸置換を導入し、3C 様プロテアーゼによる切断が起こるかどうかを見た。3C 様プロテアーゼ C 末端の Glu181 のみ保持され、それより上流の 9 アミノ酸残基が Gly あるいは Ala に置換されていても 3C/3D 切断が生じた。この結果は、切断部位の P1 部位の Glu (あるいは Gln) が 3C 様プロテアーゼによる基質認識に最も重要であることを示している。

[染谷雄一]

(14) ノロウイルス様中空粒子の立体構造解析

これまで遺伝子型 GI/1 に属する Norwalk 株の VLP の三次元立体構造が明らかにされている。ノロウイルスは多様な遺伝子型があり、組織血液型抗原結合パターンも多様である。これはウイルス粒子表面の構造が多様であることを示唆する。これを明らかにするために、昆虫細胞で発現させた Chiba407 株 (GI/4) の VLP を昆虫細胞で発現させ、精製した後、三次元結晶化を行った。現時点で約 4 Å の分解能の X 線回折データを得ている。

[染谷雄一, 長谷川和也 (高輝度光科学研究センター), 熊坂崇 (高輝度光科学研究センター)]

(15) NoV と血液型抗原との結合 : X 線結晶構造解析による結合解析

プロトタイプ Norwalk/68 (NV/68) (GI/1) 株は α 1,2 フコース (Fuc) 転移酵素遺伝子活性型の分泌型個体で感染が成立するが、不活性型の非分泌型個体では感染が成立しないことから、NoV と血液型抗原との結合には α 1,2 Fuc が不可欠と言われている。一方、 α 1,2 Fuc を含まず α 1,4 Fuc を含む Lewis a 抗原 (Le-a) のみを腸管上皮に発現する非分泌型個体でも感染する NoV 株が存在することが知られているが、詳細は明らかではない。NoV の Le-a 認識機構を明らかにするため、Le-a 結合能を有する GI/2 遺伝子型株のキャプシド P ドメインと Le-a, Le-b 複合体の X 線結晶構造解析を行った。昨年度までに GI/2 遺伝子型株による α 1,4 Fuc, α 1,2 Fuc 認識機構の詳細を明らかにした。今年度は、 α 1,4 Fuc 結合に寄与しているアミノ酸の置換により結合特異性の変化を確認することが出来た。このことはウイルスのトロピズムが 1 アミノ酸置換で容易に変化することを示している、ウイルスの多様性を生み出す構造要因の 1 つであると想像される。

[久保田智巳 (産総研), 熊谷安希子, 伊藤浩美 (産総研), 古川早苗 (産総研), 染谷雄一, 武田直和, 石井孝司, 脇田隆宇, 成松久 (産総研), 白土東子]

(16) ファージディスプレイ法による、ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離

多数の抗 NoV 抗体とそれらが認識するエピトープの同定は、中和能を有する抗体の選別や、ウイルスワクチンの設計、さらに、ウイルスレセプターや増殖機序の解明に寄与するところが大きい。本研究では、ヒト由来ファージ抗体ライブラリーから多数の抗 NoV 抗体を単離・解析し、交叉反応性抗 NoV 中和抗体の作製を試みる。今年度は、ファージ抗体ライブラリーから、NoV GI/4 株 VLP を抗原として、パニング法で NoV 特異的抗体を得た。ファージ抗体の NoV に対する反応性は、固相化した VLP にファージ抗体を反応させ、二次抗体コウサギ抗 cpIII 抗体を使用し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた ELISA 法で解析した。その結果、genotype 特異的、genogroup 内交叉反応性、そして genogroup 間交叉反応性のヒト型抗 HuNoV ファージ抗体を単離することが出来た。今後、抗原エピトープの同定を行う予定である。

[守口匡子 (藤田保健衛生大学), 染谷雄一, 白土東子, 奥野良信 (阪大微研), 黒澤良和 (藤田保健衛生大学), 谷口孝喜 (藤田保健衛生大学)]

(17) ノロウイルス遺伝子型分類の国際標準化への試みと、レファレンスプラスミドの構築

ノロウイルス (NoV) には5つのジェノグループが存在する。ジェノグループI, II, IV (GI, GII, GIV) がヒトに感染する。GI, GII にはそれぞれ20を超えるジェノタイプが報告されており、遺伝的に多様であることが知られている。これまでNoVの分類は、ORF2にコードされる構造タンパク質VP1の配列に基づいて行われてきた。しかし、NoVは非構造タンパク質をコードするORF1とORF2のジャンクション領域で高頻度に遺伝子組換えを起こし、キメラウイルスが出現することが明らかになっており、ORF1のジェノタイプも考慮に入れた新しい遺伝子型分類法の構築が望まれていた。我々の所属する国際的ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーにより、キメラウイルスに対応した新しい遺伝子型分類法の構築が始まった。これに対応するため、本年度はORF1後半(約4100nt position)からVP1 Nterminal region(約5500nt position)までを含むGI, GII用コントロールプラスミドを構築し、ノロウイルスレファレンスセンターを通じて配布を開始した。本コントロールプラスミドは、これまで同様リアルタイム RT-PCR、コンベンショナルな RT-PCR に使用できると共に、新規遺伝子型分類にも利用可能である。

[村上耕介, 朴 英斌, 戸高玲子, 片山和彦]

2. サポウイルス (SaV) に関する研究

(1) 下記のSaV VLPsを新規発現し、VLPライブラリに加えた。GII 4株、GIV 1株、合計5株

[岡智一郎, 李 天成, 片山和彦]

(2) 新規プライマーセットを用いた食用貝からのサポウイルス核酸検出系の評価

昨年度、食品からのサポウイルス核酸の検出系評価のため、サポウイルスによる集団食中毒事例の原因食材として同定した複数のサポウイルス遺伝子を含むアサリ中腸腺60個について、従来法と新規法の2つのPCR系を用いてサポウイルス核酸を増幅したところ、新規法の方が高い陽性率を示した。今年度は2つの検出系で増幅されたPCR産物の塩基配列解析を行い、いずれの系でも同様の遺伝子型配列が検出されることを確認した。

[戸高玲子, 飯塚節子(島根県保健環境科学研), 岡智一郎, 片山和彦]

(3) サポウイルス再感染急性胃腸炎事例の同定

2002年から2009年度に 熊本県内の3つの小児科を受診したサポウイルス陽性の感染性胃腸炎患者のうち、2名が、異なる遺伝子型のサポウイルスに再感染していることが明らかとなった。このうち1名はサポウイルス以外の急性胃腸炎病原因が検出されなかったため、サポウイルスもノロウイルスなどと同様、同一人物が複数回感染し、急性胃腸炎を引き起こすことを初めて明らかにした。

[原田誠也(熊本県保健環境科学研究所), 西村浩一(熊本県保健環境科学研究所), 清田直子(熊本県保健環境科学研究所), 岡智一郎, 片山和彦]

(4) SaV プロテアーゼ活性阻害化合物の同定

サポウイルスプロテアーゼの基質認識メカニズム検証のため、化合物ライブラリーデータベース(139369化合物)を用いたin silico screeningを行い、151化合物をサポウイルスプロテアーゼ活性阻害候補物質として選択した。in vitroにおけるプロテアーゼ活性阻害の評価を行ったところ、3化合物が実際にサポウイルスプロテアーゼ阻害活性を有することを見いだした。今回用いた手法は今後、他のカリシウイルスプロテアーゼ活性阻害化合物検索への応用が期待される。

[横山 勝(病原体ゲノム解析研究センター), 神田忠仁, 佐藤裕徳, 岡 智一郎, 片山和彦, 小島宏建, 長野哲雄, 岡部隆義(東京大学創薬オープンイノベーションセンター)]

(5) クライオ電子顕微鏡 インシリコモデリングの融合によるサポウイルス粒子構造の解析

ノロウイルスのVLPの3D構造は、クライオ電子顕微鏡、X線構造解析などにより、GI, GII共に詳細に解析が行われている。一方、サポウイルス (SaV) の粒子構造は、VLPの発現が困難であるため、未だ十分に明らかとされていない。我々の研究室で発現に成功したSaVのVLPを用い、クライオトモグラフィー、位相差 in silico モデリングを融合させた解析方法により、3D構造の解析を行った。現在、8Åの解像度での再構築 in silicoでの構造補正、構造に基づくアミノ酸アライメントが進行している。本研究では、アミノ酸配列と粒子構造の関係を明らかにし、NoVのようなP-dimer、P-粒子のように、粒子の抗原性を維持した構造タンパク質の部分発現を目指している。このようなタンパク質の部分発現に成功すれば、SaVの

抗原・抗体パネルの構築が容易になる。

[宮崎直幸 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 村上耕介, Hansman GS, Taylor DW (エール大学), 脇田隆彦, 片山和彦, 村田和義 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)]

3. ネコカリシウイルスに関する研究

(1) ネコカリシウイルスの新規リバーシジェネティクス系の構築

ネコカリシウイルス (FCV) は培養細胞を用いた増殖が可能であるため、ノロウイルスなど培養細胞で増殖させることができないウイルスのモデルとして利用されている。FCV ゲノムの複製、翻訳メカニズムの詳細はいまだ不明であるが、これまでに、1) *in vitro* で合成した capped RNA を培養細胞に transfection する方法、2) T7 RNA polymerase 遺伝子を保有する組換えワクチニアウイルス感染細胞に plasmid を transfection する方法で FCV が産出できることが報告されている。しかし、いずれの手法も操作が煩雑である。そこで、従来の手法より簡便な系として、FCV ゲノム cDNA をコードする plasmid を培養細胞に transfection するだけで FCV を回収できる single step リバーシジェネティクス系の構築に成功した。

本研究により新たに構築した FCV のリバーシジェネティクス系は *in vitro* での capped RNA の合成や、ヘルパーウイルスの細胞への感染を必要としないため、従来法と比較して、簡便であり、また FCV 以外の因子の干渉を考慮する必要がない。今後、FCV がコードする各ウイルスタンパク質の機能評価、ゲノム複製、翻訳メカニズムの解明への寄与が期待できる。現在 293T 細胞を用いたユニバーサルシステムを開発中である。

[岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日大獣医), 片山和彦]

4. カリシウイルスに関する研究

(1) カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性

カリシウイルスのゲノムから翻訳された open reading frame 1 (ORF1) ポリプロテインは、ORF1 にコードされるプロテアーゼによって切断される。カリシウイルスプロテアーゼには catalytic triad と呼ばれる保存残基 (His, Glu or

Asp, Cys) が存在する。本研究では Norwalk virus (NoV), feline calicivirus (FCV), Sapporo virus (SaV), および Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) を用いて保存残基の重要性を検証した。その結果、1) 共通して catalytic triad と呼ばれる His, Glu or Asp, Cys が重要、2) NoV と FCV については Glu が必要でない切断部位も存在する、3) 活性中心の Cys は Ser に置換できないことなどが明らかとなった。リバーシジェネティクスを用いた検証結果から、切断効率がわずかでも低下すると、progeny virus 産生効率が大きく低下する傾向が観察され、ORF1 ポリプロテインの正常な切断が progeny virus 産生に必須であることが示された。現在リバーシジェネティクスを用いた検証を行っている。

[岡智一郎, 横山 勝 (病原体ゲノム解析センター), 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日大獣医), 本村和嗣 (病原体ゲノム解析センター), 村上耕介, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析センター), 片山和彦]

5. ロタウイルスに関する研究

(1) 全ゲノム塩基配列解析を目的としたロタウイルス分子疫学解析手法の研究

ロタウイルスは 11 セグメントからなる 2 本鎖 RNA をゲノムとして有する。全セグメントを RT-PCR によって増幅し、全長の塩基配列を解析するため、各セグメントの 5' 端および 3' 端またはその近傍に universal primer set をデザインした。代表的な 7 種類のロタウイルス株 (Wa, DS-1, Hochi, 69M, WI61, M37, SA11-S1) について、PrimeScript® cDNA Synthesis Kit (タカラ) および PrimeSTAR® GXL DNA polymerase (タカラ) を用いて RT-PCR を行った結果、全ての株で全 11 セグメントを特異的に増幅させることができた。また、この PCR 産物から全セグメントの塩基配列を解析可能であることを確認した。今後、この primer set を用いて、我が国におけるロタウイルスの分子疫学研究を進める予定である。

[藤井克樹, 下池貴志, 片山和彦]

(2) ロタウイルスの RNA-PAGE によるパターン解析

ロタウイルスは患者便検体からゲノム RNA を抽出し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (PAGE) を行うことで、ゲノム RNA のバンドパターンを解析することができる。この方法は A 群以外のロタウイルスも検出可能であり、疫学調査において

流行株の傾向を判定する際にも有用である。ロタウイルス実験室標準株 (Wa, Hochi, 69M, WI61, SA11-S) および臨床分離株について PAGE 解析を行った結果、それぞれの株に特徴的なバンドパターンを検出することができた。ロタクロン® (TFB) を用いた ELISA 法の結果と照合したところ、PAGE で陽性、ELISA で陰性だった検体や、PAGE で陰性、ELISA で陽性だった検体が存在していたことから、ELISA による定量結果と PAGE により検出されるゲノム RNA 量は必ずしも一致しないことが示唆された。

[藤井克樹, 下池貴志, 片山和彦]

(3) ロタウイルス分離培養法の研究

ロタウイルスは、MA104 細胞などを用いてトリプシン存在下で増殖が可能である。しかし、その成功率は低く、安定しない。我々は MA104, CV-1 細胞をクローニングし、ロタウイルスのラボラトリー株に感受性の高いクローンを作製することで、効率の良いロタウイルス分離培養法の確立を目指した。従来の MA104, CV-1 と比較し、それぞれ 2~10 倍の増殖効率を示すクローンが得られた。現在、さらに高効率なクローンの確立を目指している。

[藤井克樹, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 下池貴志, 片山和彦]

(4) 5 価のロタウイルスワクチン株のウイルス含量試験の開発と、検定への応用

ロタウイルスワクチンの一つである、5 価のロタウイルスワクチン；ロタテックは、ワクチンに含まれる 5 種類のウイルスを免疫蛍光抗体法などで、分別することができないため、5 価それぞれの力価を求めるのは困難である。そこで、それぞれのウイルスに特異的なリアルタイム RT-PCR 法を確立し、高精度なウイルス定量法を確立し、国家検定に採用した。

[下池貴志, 藤井克樹, 片山和彦]

(5) 単価弱毒生ロタウイルスワクチンのウイルス含量試験法の開発と、検定への応用

ロタウイルスの感染力価は、ウイルス液を段階希釈し、MA104 細胞に接種、数日間のインキュベーションの後、細胞を固定し、ロタウイルス構造タンパク質に対する抗体を用いた免疫蛍光抗体法によって CCID50 を計算することで求める。

96 ウェルプレートのスキャン、自動撮影、蛍光シグナル鑑別・カウントプログラムをオリンパスと共に開発し、データ保存と力価測定を自動化した。電動ステージによる自動撮影により、96 ウェルプレートの各ウェルを分割撮影し、重複領域を用いて、プレート画像を再構築する。その後、各ウェルに含まれる細胞数を DAPI の蛍光ドット数で算出する。蛍光抗体によるロタウイルスの蛍光スポットは面積の規格値に入る物をカウントし、細胞数との比率を算出し、CCID50 を算出する。本自動測定、判定システムは、迅速かつ高精度な力価測定を可能とした。

[村上耕介, 戸高玲子, 下池貴志, 藤井克樹, 朴 英斌, 片山和彦, オリンパス工業]

6. その他

(1) 食品検体のノロウイルス、サポウイルス、HAV 検出のためのパンソルビン・トラップ法の改良

ウイルスに対する特異抗体と黄色ブドウ球菌菌体成分複合体を用いるパンソルビン・トラップ法 (パントラ法) は、食品検体からノロウイルス、サポウイルスを検出するための実践的な手法として有用性が期待される。これまでに、ウイルス様中空粒子に対する特異抗体を用いて、その有用性を検討してきたが、特異抗体の安定供給体制を考慮し、市販グロブリン製剤を用いることでこの中に含まれる抗ノロウイルス、サポウイルス抗体によって、これらのウイルスを効率的に食品中から検出できることを示した。さらに、グロブリン製剤は、試験的に食品に混入させたポリオウイルス、A 型肝炎ウイルスなども検出可能であることが示された。本方法は、食品からの効果的なウイルス濃縮、検出法として広く利用できる。

[斎藤博之 (秋田県健康環境センター), 東方美保 (福井県衛生環境研究センター), 田中智之 (堺市衛生研究所), 野田衛 (国立医薬品食品衛生研究所), 村上耕介, 岡智一郎, 片山和彦]

(2) 初代細胞を使用しない OPV 試験法の新規開発

OPV の国家検定において、検体の弱毒性保持を確認する試験として rct/40 マーカー試験および d マーカー試験がある。この試験では、ウイルスの増殖にカニクイザルの初代腎細胞を使用することから、動物の個体差が結果に影響する可能性があった。また、実験動物使用数削減の観点からも、初代細

胞を使用しない試験法が求められていた。そこで、初代細胞の代替として、アフリカミドリザル腎由来のGL37細胞を使用した試験法の開発を試みた結果、従来法と同様に検体を評価することができ、またアッセイ間変動の小さい新規試験法を開発することができた。

[村上耕介, 岡智一郎, 戸高玲子, 片山和彦]

(3) 弱毒ポリオウイルスセービン株由来不活化ポリオワクチンの品質管理

わが国においては、独自に開発された弱毒ポリオウイルスセービン株を用いた不活化ポリオワクチン(sIPV)、ならびにこれと現在製造販売されている沈降精製ジフテリア百日咳破傷風混合ワクチン(DPT)を混合したDPT-sIPV 4混ワクチンが開発されており、一刻も早い実用化が必要である。ウイルス第二部では、平成15年度よりはDPT-sIPV 4混ワクチンの安全性と有効性を評価するための国内参照品についての検討を行っている。今年度は、旧ロット#05Jと平行した新ロット#09Aの安定性評価、生ポリオワクチン力価を指標とした#09Aの力価評価、および適切希釈倍率の検討を行った。

[染谷雄一, 白土東子, 下池貴志, 岡智一郎, 村上耕介, 藤井克樹, 戸高玲子, 柴山恵吾(細菌第二部), 加藤はる(細菌第二部), 薄地一成(細菌第二部), 落合雅樹(品質保証室), 藤田賢太郎(品質保証室), 内藤誠之郎(品質保証室), 片山和彦, 脇田隆宇]

(4) 血液製剤におけるHCVの不活化の検討

血液製剤におけるHCVの不活化の評価はなされていない。5%アルブミン製剤にHCVを添加後1時間の液状加熱(一般に60時間)によって(10⁶)に不活化された。一方、8%エタノール処理ではHCVは不活化されなかったが、40%エタノール処理では不活化(10⁴)された。この結果はモデルウイルス; ウシ下痢症ウイルス(BVD)と同じであった。またイムノグロブリン中(4℃保存)ではHCV, BVD共に64日間は不活化されなかった。種々の不活化法に対する不活化効率の相違を明らかにしたい。

[下池貴志, 野島清子*, 脇田隆宇, 岡田義昭* (血液・安全性研究部)]

II. エンテロウイルスに関する研究

1. 実験室診断およびレファレンス活動

(1) 国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動

レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保管し、要望に応じて地方衛生研究所等に配付した。2011年度は、エンテロウイルス単抗血清67種類、ポリオウイルス標準血清1セット、ウイルス標準株9株、等を配布した。ポリオウイルスの同定および型内株鑑別検査を行政検査として実施した。[吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 清水博之]

(2) ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術集団研修 (JICA 共催) の開催

第21回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術研修としては第2回目)を実施した。研修期間は2012年1月16日～2月11日、研修参加者は、ミャンマー、パキスタン、インドネシア、フィジーから各1名、ナイジェリア、中華人民共和国から各2名の計8名であった。WHOワクチン予防可能疾患実験室ネットワークにおける国家実験室に必要な技術習得のための実習および講義を実施した。また、ポリオ根絶および麻疹排除の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った。日本脳炎、パピローマ、ロタ等、ワクチン予防可能疾患に関する講義を実施した。[清水博之, 吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 和田純子, 脇田隆宇]

(3) WHO Global Specialized Polio Laboratory (GSL) としての活動

ア) National Polio Laboratory が存在しないラオス・カンボジアの National Polio Laboratory として実験室診断を行った。本年度はカンボジア180検体およびラオス61検体のAFP由来糞便検体からポリオウイルスの分離および同定を行った。[吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 和田純子, 清水博之]

イ) WHO GSLとして、おもにカンボジア・ベトナム等で分離されたポリオウイルスについて型内鑑別あるいは塩基配列解析を行った。ポリオウイルス分離株は、すべてワクチン株であり、当該地域におけるポリオフリーの維持を確認した。

ウ) 2011年4月27-29日に、フランス、パリのパスツール研究所で開催されたWHO *Ad Hoc* Small Working Group discussion on Development and Evaluation of New Diagnosis Reagents and Approaches to Testing への参加し、簡便なポリオウイルス同定法、ポリオウイルス直接検出のためのアプローチ、新

たな中和抗体測定法の開発について情報提供を行った。[清水博之]

エ) 2011年9月5-7日に、マニラのWHO/WPROで開かれた Third Meeting on Vaccine Preventable Disease Laboratory Network in the Western Pacific Regionに参加し、ポリオ実験室の現状およびエンテロウイルスサーベイランスについての情報提供を行った。[清水博之]

オ) 2011年9月21-24日に、WHO本部で行われた The 17th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Networkに参加し世界ポリオ根絶計画の現状、WPROポリオ実験室ネットワークの現状および課題、ポリオ実験室における精度管理・バイオセーフティ等についての報告・討議に参加した。[清水博之]

(4) 国際協力活動

ア) 新疆自治区で発生した野生株ポリオ流行対策助言のため2011年11月20日-11月28日に中国新疆ウイグル自治区ポリオ実験室へ環境ウイルスサーベイランス実施計画策定を目的としJICA専門家として参加した。[吉田 弘]

イ) 2011年11月4-5日に台湾で開催された National Institute of Infectious Diseases and Vaccinology Scientific Advisory Board Committee Meetingに、Advisory Board Committeeメンバーとして参加し、研究内容および研究計画の外部評価を行った。[清水博之]

ウ) 2011年11月16日-22日にベトナム、パスツール研究所(ホーチミン市)で行われた Pasteur Institute in Ho Chi Minh City-120 Years for Control and Prevention of Communicable Diseasesに参加し、手足口病流行とエンテロウイルス71研究の現状についてKeynote Speechを行った。ハノイNIHEを訪問し、エンテロウイルス71および手足口病に関する共同研究に関する研究打合せを行った。[清水博之]

2. 西太平洋地域の2011年のポリオウイルス分離状況

2011年にラオスおよびカンボジアから送付されたAFP症例由来の糞便検体241検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。ラオス、カンボジア、ベトナム、モンゴルにおいてAFPおよび非AFP検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別あるいは塩基配列解析を行なった。当該地域では、野生株ポリオウイルスおよびVDPVは

検出されなかった。

[清水博之, 吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 和田純子, 脇田隆宇]

3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

(1) 新規ポリオウイルス・エンテロウイルス検査法の開発

世界ポリオ実験室ネットワークによるウイルス学的診断では、培養細胞を用いたウイルス分離同定に基づくポリオウイルス検査を基本としているが、検査の迅速化には限界がある。そのため、糞便等の臨床検体から、直接ポリオウイルス・エンテロウイルスを検出同定する新たな検査手法が検討されているが、検体からのポリオウイルス直接検出には、検査感度・精度に関する技術的課題が多く残されている。高価な機器あるいは高度な技術を要する検査手法を用いることなく、技術レベルの異なる多くのポリオ実験室への導入が可能な簡便なウイルス検出法(RT-LAMP法、ポリオウイルス特異的PA法等)に関する技術開発を試みた。

[有田峰太郎, 清水博之]

(2) ヒト血清中の抗ポリオウイルス(PV)中和抗体価の新規測定法の開発

野生株のカプシドを持った1,2,3型PV擬似ウイルスを作製し、ヒト血清中の抗PV中和抗体価の測定法を開発した。この新規法はSabin 1,2,3株に対する中和抗体価測定結果とよい相関を示したが、Sabin 1に対する中和抗体価との相関が比較的低かった。低年齢層でSabin 1, 高齢者で1型野生株に対する抗体価が高かった。この新規法は、従来法と異なり感染性ウイルスを用いないため、特に安全面で優れている。そのため、PV根絶計画の中で重要な役割を果たしていくと考えられた。

[有田峰太郎, 岩井雅恵(富山衛生研究所), 脇田隆宇, 清水博之]

(3) ポリオ生ワクチン接種率全国累積調査

全国から5,000人の2歳児を無作為に抽出し、居住する市区町村に、ポリオ生ワクチン1回目及び2回目、BCG、DPT1-4回目、麻疹・風疹混合ワクチン(MR)1期を接種した月齢の調査を依頼し、回収された調査票をもとに全国累積接種率を推計した。2010年の調査では、生後24ヵ月における累積接種

率は、それぞれ、96.3%および85.4%であった。不活化ポリオワクチンの円滑な導入に向けて、各種ワクチンの累積接種率調査を継続する必要がある。

[高山直秀 (都立駒込病院), 清水博之]

(4) 不活化ポリオワクチン接種者数に関する調査

不活化ポリオワクチン接種の実態を把握する目的で、インターネット上で公開されている不活化ポリオワクチン接種医療機関リストに挙げられた医療機関のうち、不活化ポリオワクチン接種が確認できた医院ないし病院を対象にして、不活化ポリオワクチン含有ワクチン接種総件数及び初回接種件数を調査票により問い合わせた。IPV 含有ワクチン接種医療機関における2011年10月の不活化ポリオワクチン報告接種件数は、全体で16,339件であった。都道府県別の接種件数では、東京都が6,098件で全体の37.3%を占めていた。不活化ポリオワクチン接種件数および接種医療機関数は2010年と比較して大幅に増加していた。

[高山直秀 (都立駒込病院), 清水博之]

(5) 不活化ポリオワクチンの円滑な導入に関する調査・研究

不活化ポリオワクチンを含めたポリオワクチンに関する基本的情報について、「不活化ポリオウイルスワクチンの円滑な導入に関する検討会」構成員として情報提供を行うとともに、不活化ポリオワクチン含有ワクチン導入にあたっての諸課題について検討を行った。

[清水博之]

(6) 成人に対する不活化ポリオワクチン追加接種の有効性と安全性の検討

わが国においても2012年の秋を目途に不活化ポリオワクチン (inactivated polio vaccine, IPV) が導入される見込みである。成人に対してIPVの追加接種を行い、免疫原性と安全性の検討を行うため、成人に対するIPV接種に関する臨床研究プロトコルを作成し、倫理委員会での承認を経て、海外からIPVを輸入し、被験者を募集し接種を開始した。

[中野貴司 (川崎医大), 福島慎二 (東京医大), 清水博之]

(7) ポリオワクチン停止後の再流行のリスク推定

生ポリオワクチン (OPV) は効果的にポリオ制圧に貢献しており、ワクチン接種により世界中の野生株根絶が期待されている。本研究ではOPV停止後、OPV由来株による流行の可能性を確率モデルに基づき議論した。ワクチンを接種した宿主はOPV由来強毒株を排泄するため、接種自体がリスクとなる。ワクチン停止後、感受性宿主密度が疫学閾値を越え、強毒株が集団に出現するのに十分な宿主密度の場合、流行の危険性がある。感染率、回復率、変異率等のパラメーター依存的に流行の可能性が90%を超えることもある。また少数の長期排泄者が存在すると、流行リスクが高まる。OPV停止後、不活化ワクチンを導入したとしても、地球上からポリオ根絶を達成するには疫学パラメーターによる制約があることを示した。

[佐々木顕 (総研大), 吉田 弘]

(8) 新規ポリオウイルス (PV) 宿主因子 VCP/p97 の同定

膜輸送に関わる宿主遺伝子を標的とした siRNA スクリーニングを行いVCP/p97をPVの複製に関わる新規宿主因子として同定した。VCP/p97は、ウイルスタンパクの3BCおよび3ABと結合し、特に2BCとの相互作用の重要性がVCPノックダウン耐性PV変異株の解析から示唆された。この耐性変異(2C-E253G)は、PV感染細胞における宿主タンパクの分泌を抑制しない変異として知られていることから、VCP/p97はPV感染における宿主タンパクの分泌経路に関与していることが示唆された。

[有田峰太郎, 脇田隆宇, 清水博之]

(9) ナイジェリアで伝播している2型VDPVの病原性の解析

1型および3型野生株ポリオウイルス伝播が継続しているナイジェリア北部では、2005年から発生した2型ワクチン由来ポリオウイルス(2型VDPV)伝播が長期間継続している。2005-2011年にかけて分離された2型VDPVの遺伝子解析の結果、ナイジェリアの2型VDPVは、多くの独立した遺伝子型(lineage)を有することが示された。異なる複数の遺伝子型に属する2型VDPV株について、ウイルス学的性状の解析を行ったところ、多くの2型VDPV株は、野生株ポリオウイルス株と類似したウイルス学的性状、とくに、2型野生株ポリオウイルス株と同程度の神経病原性を示すことが、ポリオウイルス受容体発現トランスジェニックマウス感染実験により明ら

かとなった。

[清水博之, Cara Burns, Olen Kew (米国 CDC)]

4. エンテロウイルスおよびその他腸管ウイルスに関する研究

(1) 受容体 PSGL-1 結合性エンテロウイルス 71 の感染性 cDNA クローンの作製

エンテロウイルス 71, 1095 株, SK-EV006 株, C7-Osaka 株の感染性 cDNA クローンを作製した。まず, プラスミド pBR322 にマルチクローニングサイトを含むオリゴ DNA 断片を挿入し, cDNA クローン作製のプラスミド pBR322Y を作製した。T7 プロモーターとウイルス 5' 非翻訳領域を含むセンスプライマーと, ウイルス 3' 非翻訳領域を含むアンチセンスプライマーを用いて, エンテロウイルス 71 のゲノム全長を RT-PCR で増幅した。このゲノム全長を pBR322Y のもつ適当な制限酵素サイトにクローニングした。プラスミドを精製し, T7 プロモーターによる *in vitro* transcription によりウイルスゲノム RNA を合成した。ゲノム RNA を RD 細胞にトランスフェクションしたところ, 感染性をもつウイルスが回収できた。これらのウイルスが PSGL-1 に結合することを確認した。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

(2) 受容体 PSGL-1 非結合性エンテロウイルス 71 の感染性 cDNA クローンの作製

エンテロウイルス 71, Nagoya 株および 02363 株は受容体 PSGL-1 に結合しない。これら 2 株の感染性 cDNA クローンを作製した。T7 プロモーターと 5' 非翻訳領域を含むセンスプライマーと, 3' 非翻訳領域を含むアンチセンスプライマーを用いて, エンテロウイルス 71 のゲノム全長を PCR で増幅した。このゲノム全長を pBR322Y のもつ適当な制限酵素サイトにクローニングした。プラスミドを精製し, T7 プロモーターによる *in vitro* transcription によりウイルスゲノム RNA を合成した。ゲノム RNA を RD 細胞にトランスフェクションしたところ, 感染性をもつウイルスが回収できた。これらのウイルスが PSGL-1 に結合しないことを確認した。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

(3) 受容体結合に重要なエンテロウイルス 71 キャプシドアミノ酸の絞り込み

エンテロウイルス 71 分離株には, 受容体 PSGL-1 に結合する株, 結合しない株が存在する。この結合性は, ウイルスキャプシド蛋白質の 4 つのアミノ酸のいずれかで規定されるものと予想されていた。代表的なエンテロウイルス 71 のキャプシド領域のアミノ酸配列をアライメントし, 結合性を規定するアミノ酸の絞り込みを試みた。エンテロウイルス 71 分離株 (PSGL-1 結合株 5 株, PSGL-1 非結合株 3 株) のキャプシド領域を RT-PCR にて増幅し, ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を同定した。アライメントしたところ, PSGL-1 結合株では VP1-98E/145G がみられ, PSGL-1 非結合株では VP1-98K/145E が多くみられることがわかった。つまり, VP1-98/145 により PSGL-1 結合性が規定されているものと考えられた。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

(4) 受容体 PSGL-1 結合性を規定するエンテロウイルス 71 アミノ酸の同定

エンテロウイルス 71 感染性 cDNA クローンをもとに, VP1-98/145 アミノ酸に変異導入し, これらアミノ酸と PSGL-1 結合性について検討した。VP1-98E/145G をもつ PSGL-1 結合株に, VP1-98K/145E のアミノ酸変異を導入したところ, PSGL-1 に結合しなくなった。また, VP1-98K/145E をもつ PSGL-1 結合株に, VP1-98E/145G のアミノ酸変異を導入したところ, PSGL-1 に結合するようになった。つまり, PSGL-1 結合性は VP1-98/145 により規定されていることが明らかとなった。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

(5) エンテロウイルス 71 分離株の PSGL-1 依存的ウイルス増殖の検討

これまでの解析でエンテロウイルス 71 分離株は, PSGL-1 受容体に結合する株と結合しない株に分類されることが明らかとなっている。PSGL-1 発現 Jurkat 細胞におけるウイルス増殖および抗 PSGL-1 抗体 KPL1 処理によるエンテロウイルス 71 増殖阻害の有無により, PSGL-1 結合株および非結合株を同定することが可能である。異なる genogroup のエンテロウイルス 71 分離株 (genogroup B1, B2, B5, C3) について, Jurkat 細胞における PSGL-1 依存的ウイルス増殖を検討したところ, B1 株 (Nagoya および Taiwan 株) 以外は, Jurkat 細胞で PSGL-1 依存的に増殖した。エンテロウイルス 71 株の genogroup と,

PSGL-1 結合性・PSGL-1 依存的増殖には、直接的な関連性は認められなかった。

[Rifqiyah Nur Umami, 西村順裕, 清水博之]

(6) 培養細胞でのウイルス分離過程における PSGL-1 依存性エンテロウイルス 71 株の選択的増殖の検討

臨床検体からのエンテロウイルス 71 の分離には、RD 細胞や Vero 細胞等が用いられている。これらの細胞は、PSGL-1 発現 Jurkat 細胞と比較すると、エンテロウイルス 71 受容体 PSGL-1 の発現レベルは低い。ウイルス分離過程における、PSGL-1 結合性および PSGL-1 結合に関与するカプシドアミノ酸の変化を検討するため、臨床検体そのもの、および、臨床検体を接種した後の、RD, Vero, Jurkat の各細胞における CPE 発現とカプシドアミノ酸解析 (VP1-98 および VP1-145) を行った。手足口病患者等の臨床検体から、直接 VP1 部分領域を増幅し、PSGL-1 結合性に関与するアミノ酸部位を解析したところ、被検検体は、すべて PSGL-1 非結合性 EV71 を含むことが示唆された。エンテロウイルス 71 陽性検体を接種した Jurkat 細胞では、ウイルス増殖は認められなかった。RD 等の細胞で分離した EV71 株を Jurkat 細胞で継代すると、PSGL-1 結合型 EV71 variant が選択的に増殖した。RD 細胞でも、5~6 代のウイルス継代により PSGL-1 結合型 EV71 variant が優位に増殖する傾向が認められた。培養細胞におけるウイルス継代により、PSGL-1 結合型 EV71 variant が選択的に分離されることが示唆され、また、細胞により PSGL-1 結合型 variant 増殖効率に差があることが明らかとなった。

[Rifqiyah Nur Umami, 西村順裕, 清水博之, 細見卓司 (高知県食肉衛生研究所)]

(7) エンテロウイルス 71 脳炎の病理学的解析

エンテロウイルス 71 感染症重症化のメカニズムを解明するため、重症エンテロウイルス 71 感染事例 (エンテロウイルス 71 脳炎) の中枢神経組織の病理学的比較解析を行った。エンテロウイルス 71 脳炎の一般的な特徴として、脊髄、脳幹、視床下部、小脳歯状核に強い炎症像が認められたが、橋、視床、海馬、小脳皮質等には明らかな炎症は認められなかった。日本脳炎とエンテロウイルス 71 脳炎の病理像は明らかに異なることから、本研究成果は、エンテロウイルス 71 脳炎の病理学的鑑別診断に応用可能である。

[Wong Kum Thong (マラヤ大学), 永田典代 (感染病理部), 清水博之]

(8) エンテロウイルス 71 感染の数理学的解析

ヒト RD 細胞の倍力時間を、細胞数計数および数理科学解析により推定した。EV71 1095 株, KED005 株, 02363 株のウイルス液を MOI 0.01 で感染させ、i) 培養上清中のウイルス量, ii) 感染細胞数, iii) 非感染細胞数をそれぞれ算出し、数理科学解析に用いた。1095 株, KED005 株, 02363 株に感染した細胞の寿命は、ほとんど差異がなかった。バーストサイズおよび基本再生産数において、1095 株と KED005 株は、02363 株と比較して統計的に有意かつ顕著な差異が認められた。本手法を用いることにより、通常の実験科学に基づいた解析では求めることができない、各ウイルス株の複製における動的なパラメーターを定量的に算出することができ、EV71 の流行・伝播効率を示すものであることが推察された。

[佐藤 佳, 小柳義夫 (京都大学), 西村順裕, 清水博之]

(9) 手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の入院症例に関する全国調査

手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症による入院症例の臨床疫学像を把握するために全国調査を実施した。全国の病院の小児科から、層化無作為抽出法にて病床規模別に選定した。一次調査票を用いて入院症例数と死亡症例数の情報を収集し、患者数を推定した。二次調査では調査個人票により臨床疫学特性に関する情報を収集した。全国の小児科 2507 科から 760 科を抽出して調査を実施し、521 科 (68.6%) から回答を得た。「症例あり」と回答した 126 科より 1094 例 (うち死亡 5 例) の入院症例数が報告された。2011 年 6 月に二次調査を開始し、86 科 (68.3%) より 365 例 (うち死亡 2 例) の情報を収集した。

[福島若葉 (大阪市立大学), 中野貴司 (川崎医科大学), 清水博之]

(10) 2010 年中国広東省で報告された急性出血性結膜炎の流行像

広東省では CA24v (HEV-C) による急性出血性結膜炎のアウトブレイクが 2007 年と 2010 年に報告された。2010 年流行時の患者の約 7 割は成人に至るまで幅広く報告され、9 歳以下で患者

数のピークが見られた。2007 及び 2010 年に分離された代表株について全ゲノム配列を比較したところ、22 か所でアミノ酸が異なっていた。VP1 塩基配列を用いた系統解析の結果、2007 年、2010 年分離株とも 2000 年以降アジア地域で報告されているゲノタイプ 4 に属していることを示し、クラスター内で変異が蓄積していることを示唆した。

[Zheng Huangying (広東省 CDC), 吉田 弘]

(1 1) 中国山東省 2 地域における環境ウイルスサーベイランスにて検出された Echo11 型の分子疫学解析

環境サーベイランスにより、2010 年に E11 は Jinan, Linyi 市で各々 22, 32 株検出された。系統解析の結果、山東省由来 E11 は 1-4 クラスターに分かれ、クラスター 1 には Jinan, Linyi 株が属し、通年検出、クラスター 4 に属した Linyi 株の一部は、4-8 月に検出された。このように監視を継続することで E11 の伝播様式が地域で異なっていることを明らかにした。なお疾患サーベイでは E11 起因と考えられるエンテロウイルス感染症と考えられる流行の報告はされていない。即ち E11 感染の多くは不顕性であったことが示唆される。このように下水中のウイルスモニタリングは E11 の疫学を理解する上でベースラインデータとして有用であると考えられる。

[Wang Haiyan, Tao Zexin (山東 CDC), Zhang Yong (中国 CDC), 吉田 弘]

(1 2) 国内外における手足口病流行に関与するコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子解析

わが国で 2011 年春から夏にかけて検出/分離された手足口病患者由来 CA6 は、回復後、約 1 カ月後に爪甲脱落症が見られることから、同シーズン分離株の塩基配列情報と過去の国内外株と比較を行った。その結果、2008 年に欧州で爪甲脱落症が報告された株と 2011 年の国内分離・検出株は一つのクラスターを形成しており、遅くとも 2009 年には存在していたことを示した。解析した領域は VP1 部分領域であり、今季の特徴である強い発疹像、爪甲脱落症との関係については詳細な検討が必要となろう。

[増本久人 (佐賀県衛生薬業センター), 中田恵子 (大阪府立公衆衛生研究所), 高尾信一 (広島県県立総合技術研究所), Tao Zexin (山東省 CDC), Zhang Yong (中国 CDC), 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未 (感染症情報センター), 吉田 弘,

清水博之]

(1 3) ベトナムにおける手足口病流行の解析

ベトナムでは、2005 年以来、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されており、2011 年には、150 例以上の手足口病死亡例が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。ベトナム NIHE と感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有を基盤として、ベトナムで近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、2011 年の EV71 株の多くが、ベトナム固有の遺伝子型 C5 ではなく遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。ベトナムでは、近年、主要な EV71 遺伝子型が C5 から C4 に入れ替わった可能性が示唆された。

[Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE), 清水博之]

(1 4) 中国における手足口病の疫学とエンテロウイルス遺伝子解析

中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2010 年には、中国全土で 850 例以上の手足口病死亡例が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。中国 CDC および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有体制を基盤として、中国で近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、すべての EV71 株が、中国本土固有の遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。日本を含む東アジア他の地域では、異なる EV71 遺伝子型の流行・伝播が頻繁に認められるのに対し、中国本土で検出される EV71 株は、ほとんどすべて遺伝子型 C4 しか検出できない点は、今後の EV71 ワクチン開発にとって重要な疫学的特徴と考えられる。

[Zhang Yong, Xu Wenbo (中国 CDC), 清水博之]

(1 5) コクサッキー B 群ウイルスの腫瘍溶解性の検討

近年、ウイルス自身が本来有する腫瘍溶解性を利用した、腫瘍溶解ウイルス療法が注目されてきており、腫瘍溶解性アデノウイルスもしくは単純ヘルペスウイルスを用いた臨床研究が進められている。新たな腫瘍溶解ウイルス療法の開発を目的に、RNA ウイルスであるピコルナウイルス科のエンテロウ

ウイルス属に着目して、これまでに約 40 種類のウイルスを各種ヒト癌細胞株(非小細胞肺癌, 大腸癌, 乳癌, 膀胱癌, 腎癌, 子宮頸癌, 前立腺癌, 線維肉腫, 白血病)及び腎臓, 肺および骨髄ストローマ正常細胞に *in vitro* で感染させ, それらの抗腫瘍効果について比較検討した. その結果, コクサッキーウイルス B3 が, 正常肺線維芽細胞を障害することなく, 低い感染力によっても肺癌細胞を特異的に溶解することを発見した. コクサッキーウイルス B3 は担癌マウスを用いた *in vivo* モデルでも高い抗腫瘍活性を示し, 抗腫瘍免疫を効果的に誘導することにより抗腫瘍効果を発現することが示唆された.

[宮本将平, 井上博之, 谷憲三朗 (九州大学), 清水博之]

(16) ヒトカルジオウイルス国内分離株の遺伝子解析

近年, カルジオウイルス属に分類される新たな腸管ウイルス (Saffold virus) の検出が世界各地で報告されている. 日本でも, この新たなヒトカルジオウイルスの検出が, 最近報告されているが, 我が国における伝播実態と特定疾患への関与は明らかでない. 高知県で, 無菌性髄膜炎および手足口病患者より分離された不明ウイルス 2 株について, Saffold virus 3 型に近縁であることが示唆された. また, 病原体サーベイランス由来検体から, Saffold virus 2 型株も検出・分離された. Saffold virus 分離株は, LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞において CPE の発現を伴って増殖したが, 他のヒト細胞では顕著なウイルス増殖は認められなかった.

[細見卓司 (高知県食肉衛生研究所), Naeem Asif, 清水博之]

(17) Saffold virus 感染の血清疫学的解析

Saffold virus (SAFV) は, 小児の気道炎, 胃腸炎, 無菌性髄膜炎患者の咽頭ぬぐい液, ふん便, 髄液の検体からの検出されており, 脳炎による単徴候性運動失調患者の髄液・ふん便, および何の疾病もなかった突然死患者の髄液・血液・心筋からも検出されている. しかし, SAFV 感染と特定の疾患との関連性については解明されていない. SAFV-2, 3 の流行状況を調査するため, 血清中の SAFV-2, 3 に対する中和抗体保有状況を調査し, また, 感染症発生动向調査の検体について SAFV の検出を行った. SAFV-2, 3 に対する中和抗体陽性率は, 8-9 才で上昇し, 10-11 才~18-20 才でピークに達した後, その後緩やかに減少していった. 抗体保有率のピークは, SAFV-2, 3 それぞれ 83.5%, 83.3% であった.

[細見卓司 (高知県食肉衛生研究所), Naeem Asif, 清水博之]

(18) パキスタン・アフガニスタンの急性弛緩性麻痺患者糞便検体からのヒトカルジオウイルスの検出と遺伝子解析

近年, カルジオウイルス属に分類される新たな腸管ウイルス (Saffold virus) の検出が世界各地で報告されている. パキスタンおよびアフガニスタンにおける AFP サーベイランスにより採取された糞便検体のうち, パキスタン NIH にてポリオウイルスおよびエンテロウイルスを検出した糞便検体以外の検体から, Saffold virus 遺伝子検出およびウイルス分離を試みた. Saffold virus 特異的 RT-PCR およびリアルタイム PCR システムにより, Saffold virus 遺伝子が高頻度に検出された. LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞を用いたウイルス分離を試みたところ, 多数の CPE 因子が検出されたが, 解析の結果, ほとんどが非ポリオエンテロウイルスによる CPE であることが示された. 糞便中の Saffold virus は, LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞における増殖効率が低く, 通常的手法ではウイルス分離は困難であることが明らかとなった. 糞便中から直接 Saffold virus 遺伝子を増幅し, 遺伝子解析を行ったところ, これまでに報告されている以上に多様な遺伝子型 (11 genotypes) の Saffold virus の存在が明らかとなった. Saffold virus は多様な遺伝子型を有し, ヒト腸管ウイルスとして広範に伝播していることが示唆された.

[Naeem Asif, 西村順裕, 清水博之, Syed Sohail Zahoor Zaidi (パキスタン NIH)]

(19) Saffold virus 全塩基配列解析によるゲノム遺伝子組換えの解析

新たなヒトカルジオウイルスとして注目されている Saffold virus の遺伝的多様性とゲノム遺伝子組換えについて解析するため, 新たに同定した遺伝子型を含む 11 遺伝子型すべての Saffold virus 全塩基配列を解析し, 様々な解析手法を用いた遺伝子組換えの解析を行った. 異なる遺伝子領域における分子系統解析, ゲノム遺伝子組換え領域のマッピング等の解析により, 異なる遺伝子型の Saffold virus においては, 非カプシド領域で頻繁にゲノム遺伝子組換えが生じていることが示された. 一方, 他のカルジオウイルスと Saffold virus との遺伝子組換えの可能性は低いことが明らかとなった. 多様な遺伝子型を有する Saffold virus では,

ヒトに恒常的に伝播する過程で頻繁かつ多様なゲノム遺伝子組換えを生じていること、また、分子系統学的解析結果と自然感染における宿主域を考慮した場合、Saffold virus は他のカルジオウイルスと独立した単独の species に属するヒトカルジオウイルスに分類されることが示唆された。

[Naeem Asif, 清水博之]

(20) ヒトカルジオウイルス (Saffold virus; SAFV) 感染性クローンの作製

高知県で分離された髄液からの臨床分離株 JPN08-404 (SAFV type 3) を材料として、RT-PCR により得たゲノム全長を含む SAFV cDNA クローン (pSAF404) を作製した。pSAF404 由来 RNA の感染性を確認するために、HeLa 細胞にトランスフェクションして SAFV を産生させた。pSAF404 を鋳型として、T7 RNA polymerase により感染性 RNA の合成を行ったが、得られる転写産物は、完全長 RNA を含まない短鎖化された RNA であった。その原因として、SAFV ゲノム上に存在する human preproparathyroid hormone (PTH) シグナル相同配列の関与が示唆されたことから、PTH シグナルの影響を受けない *CGA 7* RNAP を用いて RNA 合成を行ったところ、完全長 RNA の合成が確認され、さらに、PTH シグナルを欠損させることで、一般的な T7 RNAP でも完全長 RNA が合成された。*CGA 7* RNAP で合成した RNA は、HeLa 細胞へのトランスフェクションにより SAFV を産生したことから、感染性 RNA であることが確認された。

[姫田敏樹, 大原義朗 (金沢医大), 細見卓司 (高知県食肉衛生研究所), Naeem Asif, 清水博之]

(21) 新規カルジオウイルスの病理学的診断法に関する研究

新規ヒトカルジオウイルスの病理学的診断法を確立することを目的として、参照標本を用いて、免疫組織化学染色法に用いるための抗体の作製、選別を行った。また、鑑別診断のための各種エンテロウイルス抗体、カルジオウイルス抗体の交差反応性について検討した。その結果、ホルマリン固定標本パラフィン包埋切片上の SAFV3 抗原を検出するシステムを確立した。sABC 法において、SAFV3 抗原と抗 EMCV 抗体との交差反応性がみられたため、特異性に関しては更に検討が必要である。

[小谷 治, 永田典代 (感染病理部), Naeem Asif, 清水博

之]

(22) タイ国の小児下痢症便からのサフォールド・カルジオウイルスの検出

サフォールドウイルスはピコルナウイルス科のカルジオウイルス属に属する。呼吸器疾患および胃腸炎に関係があるとされている。サフォールドウイルスは日本を含め幾つかの国で報告されている。ここでは2007年、チェンマイ150名の小児胃腸炎児において分子疫学的手法で調べた。4名(2.7%)が陽性であった。すべてに他の下痢症ウイルスとの混合感染であった。分子系統解析では1~9の型に分かれるが1, 2型がそれぞれ2株検出された。

[牛島廣治 (日本大学), 清水博之]

5. ポリオウイルスのバイオセーフティ及びバイオセキュリティシステムに関する調査研究

(1) 日本におけるポリオウイルス野生株保有状況

世界的ポリオ根絶達成およびその後の OPV 接種停止を視野に入れ、WHO は「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画」を策定し、全世界で統一された基準の下、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを、すべての加盟国に求めている。我が国では、西太平洋地域における野生株ポリオウイルス伝播の終息を受け、2000-2002 年にかけて大規模かつ広範な野生株ポリオウイルス保有施設調査が行われたが、調査票の全体的な回収率が低く、調査精度とその後フォローアップに関する多くの問題点が指摘されていた。2000-2008 年における各種の野生株ポリオウイルス保有施設調査により得られた情報を、厚生労働省と国立感染症研究所により集計・評価し、野生株ポリオウイルス感染性材料を保有する可能性のある施設をリストアップしたうえで、所管省庁の了解のもと各施設に対し保有状況調査を実施し、野生株ポリオウイルス感染性材料保有施設を特定した。保有施設リストを含む野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階最終評価報告書を作成し WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出し 2008 年 12 月、WHO 西太平洋地域全体の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査完了が宣言された。2011 年度は、前年度に行われたポリオウイルス関連文献サーベイにより抽出された研究施設及び国立感染症研究所ウイルス第二部等にポリオウイルス分与あるいは移動に

ついて照会あるいは問い合わせのあった施設に対し、野生株ポリオウイルス新規保有の可能性を有するため保有状況調査を実施し、保有施設データベースを更新した。

[小松俊彦, ルナル純子, 斎藤真紀 (バイオメディカルサイエンス研究会), 清水博之]

(2) 国際的なバイオリスク管理基準に基づくポリオウイルス実験室封じ込めの研究

WHO 本部ポリオ実験室ネットワーク事務局から提供されたポリオ実験室バイオセーフティ教育訓練用 DVD の内容を確認し、本教育訓練資料を用いた WHO バイオセーフティワークショップ (WHO/WPRO, マニラ) に参加した。WHO ポリオ実験室教育訓練 DVD は、すでに一般的なバイオセーフティに関する教育訓練を終了し、ポリオウイルスを含む病原体や臨床検体の取扱いに従事している検査担当者あるいはバイオセーフティに関する教育訓練を担当する教育訓練指導者を対象としており、実験室・検査室で実際に発生する可能性のある多くの問題点が、過不足なく取り上げられている。取り上げられている問題点の多くは実験室のバイオセーフティに関わる事例だが、機器の維持管理、情報セキュリティ、バイオセーフティ以外の実験室安全管理、実験室のアレンジメント、等多様な事例が具体的に取り上げられており、病原体を取扱う実験室の安全管理の全体像を理解するうえで有用な教育訓練資料といえる。国際的に標準化されたバイオセーフティ教育プログラムのひとつとして、ポリオ実験室のみならず、臨床検体や病原体を取扱う国内外の実験室・検査室における教育研修への活用が期待できる。

[伊木繁雄 (バイオセーフティ管理室), 清水博之]

III. 肝炎ウイルスに関する研究

1. A 型肝炎ウイルス (HAV) に関する研究

(1) スリランカの A 型肝炎流行における疫学調査 (2)

昨年に引き続き、ビクトリー・ミリタリー・ホスピタル (スリランカ軍病院) における急性肝炎患者検体 (新規 98 検体) の確定診断を行った。今回もほとんどが A 型肝炎と診断された。

今後、さらに詳細な疫学的検討を行う。

[清原知子, Dahanayaka N (スリランカ・Rajarata 大学), 佐藤知子, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 脇田隆字]

(2) 日本における 2011 年の A 型肝炎の分子疫学的解析

2011 年の急性 A 型肝炎は、国立感染症研究所感染症情報センターの集計では第 47 週時点で 174 例が報告されているが、そのうち合計 52 検体について地方衛生研究所などとの協力により配列解析を行うことができた。その半分以上に当たる 34 検体は 1 月から 2 月にかけての千葉市を中心とする大きな流行によるもので、配列はすべて同一であり、昨年の解析で IA-1 と名付けた日本に常在すると考えられるクラスターに属していた。昨年の広域流行の原因の 1 つとなった東南アジア由来と考えられる IA-2 に相当する株は 1 株のみであり、本クラスターに属する株は日本に定着せずほぼ消失したものと考えられた。韓国由来と考えられる genotype IIIA に属する株は 5 株が検出され、しかも地域的な偏りが見られないことから、日本に定着したことが懸念される。また、近年報告のなかった genotype IIIB が 1 株検出された。

[石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, *島田智恵, *中村奈緒美, *多田有希, **上間 匡, **野田 衛, 脇田隆字 (*感染症情報センター, **国立衛研食品衛生管理部), 他 26 地方衛生研究所との共同研究]

(3) 日本で検出された Genotype IIIA の HAV の由来

韓国では 2006 年から A 型肝炎の大流行が報告され、その際に主要な Genotype が IA から IIIA にシフトしていることが判明している。日本でも IIIA の検出が増えつつあるため、韓国からの流入の可能性を検討した。韓国から 2009 年に検出された HAV40 株 (IA 2 株, IIIA 3 8 株) の配列情報の提供を受け、日本で 2010 年に検出された株との比較を行ったところ、IIIA はほとんどが韓国株と同一のクラスターに分類され、韓国からの流入の可能性を強く示唆する結果となった。

[石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, 千斗城 (韓国 CDC), 野田 衛 (国立衛研食品衛生管理部), 脇田隆字]

(4) HAV 増殖阻害に関する研究

IFN- α , IL-29 の HAV-IRES 依存性翻訳および増殖に対する効果を検討した。IFN- α , IL-29 いずれも in vitro reporter

assays では強い HAV 増殖阻害作用を示したが、培養細胞 GL37 と馴化 HAV を用いた増殖阻害試験では、IL-29 の増殖阻害作用は認められなかった。両者の作用機序の差違について研究を進めている。

[清原知子, 神田達郎 (千葉大学大学院), 石井孝司, 脇田隆字]

2. B型肝炎ウイルス (HBV) に関する研究

(1) HBV 産生細胞の解析

HBV 産生細胞株の単一細胞クローニングをおこなった。各細胞クローンの培地中に放出される HBs タンパク質および HBV DNA を経時的に ELISA およびリアルタイム PCR により測定した。またこれらの株のラミブジン感受性を調べた。

[渡士幸一, 脇田隆字]

(2) HBV 吸着, 侵入等初期過程を阻害する生理活性物質の同定

HBV 生活環の中で吸着, 侵入等の初期過程を評価する実験系, 検出系を構築した。この系において, HBV 感染を阻害する生理活性物質をスクリーニングした。

[渡士幸一, 内田奈々子, 脇田隆字]

(3) B型肝炎の血清疫学調査

感染症情報センター血清バンクの検体を用いて HBs 抗原陽性率を調査した。12 府県から集められた 4-6 歳児の血清 1000 検体について HBs 抗原を測定したところ, 3 検体 (0.3%) から HBs 抗原が検出された。従来日本で報告・推定されてきた当該年齢の抗原陽性率より高く, このことについて検証を行うとともに, 更に検体を増やした調査を計画している。

[清原知子, 石井孝司, 脇田隆字]

(4) B型肝炎ワクチンの試験管内試験法の検討および in vivo 試験との相関

HBs 抗原測定系, Binding ELISA と Inhibition ELISA を構築し, その有用性について検討を行った。Binding ELISA は繰り返し試験のばらつきが Inhibition ELISA より小さく, より安定した試験と考えられた。次に, 通常のワクチンと, それを加温変性した低力価ワクチンについて in vivo 試験と Binding ELISA で相対力価を測定した。In vivo 相対力価と

Binding ELISA による in vitro 相対力価の相関は, メーカーによって異なった。この点について, 原因の解明, 及び, 運用面での対応に関して更に検証が必要である。

[清原知子, 塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, 石井孝司, 脇田隆字]

3. C型肝炎ウイルスの研究

(1) 遺伝子型 2b のウイルス産生系の構築

培養細胞で効率よく増殖し, 感染性ウイルスを産生できる遺伝子型 2b のウイルス株は未だ存在しない。そこで遺伝子型 2b のウイルス株を用いて JFH-1 株とのキメラを作製した。5' UTR, NS3 ヘリカーゼ領域, NS5B 領域, 3' UTR を JFH-1 株に置換したキメラ遺伝子に長期培養により得られた 5 つの適応変異を加えることにより, 遺伝子型 2b の株は培養細胞で増殖し, JFH-1 株より効率よく感染性ウイルス粒子を産生できるようになった。

[村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(2) 遺伝子型 2b の HCV のインターフェロン感受性の評価

非構造領域が JFH-1 株由来の配列を持つ MA キメラ株 (MA/JFH-1) と, JFH-1 の最少領域を持つ MA キメラ株 (MA/N3H+5BX-JFH1/5am) を用いて, インターフェロン感受性を評価した。Huh-7.5.1 細胞を用いた検討では, JFH-1 はインターフェロン耐性を示した。2 種類の MA キメラ株はいずれも JFH-1 よりもインターフェロン感受性であったが, MA/N3H+5BX-JFH1/5am は, JFH-1 の領域が多い MA/JFH-1 よりもさらにインターフェロンに感受性を示したことから, 遺伝子型 2b の MA 株は JFH-1 株よりもインターフェロン感受性であることが示唆された。

[村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(3) 培養細胞で非増殖型のウイルス株を増殖型にする変異の同定

培養細胞での増殖がみられない HCV J6CF 株を増殖可能なウイルスに改変するために必要な点変異の同定を試みた。ウイルス RNA を導入した細胞を長期に培養することにより, NS4A 領域に適応変異が得られた。J6CF 株にこの適応変異と, NS5B 領域, 3' UTR 領域の JFH-1 株型の変異を導入することにより, J6CF 株の全長 RNA は自律的に複製し, 感染性ウイルス産生が

可能となった。ヒト肝細胞キメラマウスにこのウイルスを接種したが、感染は成立しなかった。

[村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(4) 新規細胞株を用いた効率の良いHCV培養系の作製

HuH-7細胞からクローニングした細胞株, HuH-7T1細胞を利用すると従来使われているHuh-7.5.1細胞と比較して約10倍のウイルスが得られた。この細胞では細胞内での感染性ウイルス粒子形成の効率が高かった。またHuh-7.5.1細胞はHCV複製により細胞周期が停止し、細胞増殖が阻害されるが、HuH-7T1細胞ではHCV感染により細胞周期に影響を受けなかった。

[村山麻子, 菅野美津子(東芝RDC), 吉村斉湖(東芝RDC), 三代俊治(東芝病院), 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(5) HCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量測定パネルの作製と評価

HCVのライフサイクルに関する34種類の宿主因子の発現量を測定できるパネル(宿主因子発現測定パネル)を作製した。この宿主因子発現測定パネルを用いてHuH-7T1細胞およびHuh-7.5.1細胞の宿主因子の発現量を測定し、比較した。HuH-7T1細胞ではCD81の発現量がわずかに低く、これはFACSで細胞表面のCD81の発現を解析した結果と一致していた。また、粒子形成に関わる宿主因子の発現は全体的にHuH-7T1細胞の方が高かったが、突出して発現の高いものは見られなかった。

[村山麻子, 菅野美津子(東芝RDC), 吉村斉湖(東芝RDC), 三代俊治(東芝病院), 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(6) HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

HuGK-14細胞, MRC-5細胞, およびHEK293細胞のHCV産生能を検討した。それぞれの細胞に全長JFH-1 RNAを導入し、HCVのゲノム複製およびウイルス産生を検討したが、いずれの細胞でもHCVのゲノム複製, ウイルス産生は観察されなかった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(7) HuH-7以外の細胞株における宿主因子の発現量測定

HuGK-14細胞, MRC-5細胞, およびHEK293細胞のHCVライフサイクルに重要な宿主因子の発現量を, 宿主因子発現測定パネルを用いて測定した。その結果, HuGK-14細胞では複製に関わるCKB, 粒子形成に関わるApoE, cPLA2の発現量がHuh-7.5.1と比べて低かった。MRC-5細胞ではEntryに関わるClaudin-1, 複製に関わるCKB, 粒子形成に関わるApoEの発現量が低かった。HEK293細胞では, Entryに関わるClaudin-1, 粒子形成に関わるApoEの発現量が低かった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(8) HCVの生活環に関与するプロテインキナーゼの同定と機能解析

Alpha Screen解析, in vitroリン酸化アッセイを行い, NS5Aの高リン酸化を制御し, 感染性HCV産生に関与する新規プロテインキナーゼを同定した。細胞分画解析及び蛍光顕微鏡観察により, 同定プロテインキナーゼのノックダウンがNS5Aの細胞内局在を変化させることを見出した。

[政木隆博, 村山麻子, 澤崎達也(愛媛大), 遠藤弥重太(愛媛大), 鈴木哲朗(浜松医大), 加藤孝宣, 脇田隆字]

(9) NS5Aの高リン酸化に関与するアミノ酸残基の同定

NS5Aの高リン酸化はHCV複製, 粒子形成の制御, 並びに両者間のスイッチングに関与することが想定されている。また, 近年開発されたNS5A阻害剤の作用標的としても注目されているが, NS5Aの高リン酸化に関与するアミノ酸残基は未だに確定していない。我々は, NS5Aの高リン酸化に関与するプロテインキナーゼをノックダウンしたHCV RNA導入細胞からNS5A蛋白質を精製後, 質量分析法による解析を行い, NS5Aの高リン酸化に関わるアミノ酸残基を同定した。

[政木隆博, 村山麻子, 野村文子(横浜市大), 平野久(横浜市大), 鈴木哲朗(浜松医大), 加藤孝宣, 脇田隆字]

(10) プロテインキナーゼ阻害剤のHCV増殖抑制効果の検討

HCV感染細胞を用いてプロテインキナーゼ阻害剤のHCV増殖抑制効果を検討した。4種類のカゼインキナーゼ阻害剤においてHCV増殖抑制効果が認められた。現在それらの作用機序の解析を行っている。

[政木隆博, 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(1 1) NS5A 結合ペプチドの HCV 増殖抑制効果の検討

大腸菌発現システムを利用し、JFH-1 株 NS5A 蛋白質を発現精製した。この精製 NS5A 蛋白質を用いて 11 種類の NS5A 結合ペプチドを取得した。次に、取得ペプチドを HCV サブゲノミックレプリコン細胞に導入し、各 NS5A 結合ペプチドの抗 HCV 作用を解析したところ、11 種類の NS5A 結合ペプチドのうち、9 種類において HCV ゲノム複製の有意な抑制効果を認めた。

[政木隆博, 村山麻子, 菅裕明(東大先端研), 鈴木哲朗(浜松医大), 加藤孝宣, 脇田隆字]

(1 2) JFH-1 core と種々の株の NS5A との相互作用の解析

Core と NS5A の相互作用は HCV 感染性粒子産生の初期段階に重要である事が知られている。JFH-1 株及び、野生型では培養細胞内で増殖しない H77, Con1, J6CF, MA 株の NS5A と JFH-1 の core を 293T 細胞に強制発現させ、core による免疫沈降法により相互作用を比較した。その結果、H77, Con1, MA 株の NS5A において core との相互作用の増強を認めた。一方 J6 株では JFH-1 株と同等であった。

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(1 3) JFH-1 株における NS5A の置換がウイルス増殖に与える影響

JFH-1 株の NS5A 全体を 1a 型 H77c 株, 1b 型 Con1 株, 2a 型 J6CF 株, 2b 型 MA 株にそれぞれ置き換えた全長キメラ株を作製し、これらの増殖を検討した。H77c 株に置き換えたキメラ株では複製能及び粒子産生ともに変化せず、Con1 株に置き換えたキメラ株では、複製、感染性粒子産生に低下が見られた。一方、J6 及び MA 株に置き換えたキメラ株では、複製能に変化は無く感染性粒子産生のみ上昇した。

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(1 4) JFH-1 株における NS5A の C 末端領域の置換がウイルス増殖に与える影響

J6CF 株及び MA 株は野生型では培養細胞内で増殖出来ないが、JFH-1 株の NS5A をこれらの株に置換すると感染性粒子産生能が上昇する。この原因として NS5A-5B 間の切断効率の変化が考えられた。これを確認するため、JFH-1 株の NS5A の C 末 10 アミノ酸を J6 型、或は MA 型にした変異体を作製し、増

殖能を検討した結果、この領域の置換のみで感染性粒子産生の上昇を認めた。

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(1 5) HCV JFH-1 キメラ株を用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価

HCV JFH-1 株の NS5A 領域を H77 株 (1a 型), Con1 株 (1b 型), J6CF 株 (2a 型), MA 株 (2b 型) の NS5A に入れ換えたキメラ株を作製し、NS5A 阻害剤 (BMS-790052) に対する感受性を評価した。NS5A 阻害剤の投与によりすべてのキメラ株で用量依存的に複製阻害を認めた。しかし、その阻害活性は株により異なり、遺伝子型 1 のキメラ株では高い感受性を示したが、遺伝子型 2 のキメラ株では抵抗性であった。

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(1 6) クローン化された HuH-7 細胞株の IL-28B の SNP の検討

医薬基盤研 JCRB 細胞バンクから入手したオリジナルの HuH-7 細胞を用い、限界希釈法によるクローニングを行うことでいくつかの細胞株を得た。それらの中から、内因性インターフェロン (IFN) シグナル関連分子である RIG-I および MDA5 の発現が良い細胞株 HuH-7T5 と 7T10 において、IFN 治療の感受性に関わる IL-28B の SNP の検討を行った。既報の IL-28B の SNP 領域(rs8099917)を増幅するプライマーを用い、これらの細胞のゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行い、ダイレクトシーケンス法で SNP 領域の塩基配列を確認した。その結果、オリジナルの HuH-7 細胞では SNP が G/T のヘテロであったが、HuH-7T5 と 7T10 は T/T のホモであり、親細胞とは異なっていた。

[藤田めぐみ, 菅野美津子(東芝 RDC), 吉村斉湖(東芝 RDC), 杉山奈央, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(1 7) HCV による ISGs と各種 IFN の誘導能の検討

HCV の肝細胞への感染による IFN 誘導の評価のため、HuH-7T5 細胞に JFH-1 株全長の RNA を導入し、IFN および ISGs の mRNA を測定した。その結果、poly I:C と同程度の誘導が認められた。そこで、次に肝細胞への HCV 感染による IFN の誘導について検討を行った。感染力価の高い HCV JFH-1 適応変異株を HuH7.5.1 細胞と HuH-7T5 細胞に感染させ、IFN および

ISGsの誘導を評価した。しかし、全長HCV RNAの導入で観察されたような誘導は認めなかった。そこで、HCV JFH-1株の培養上清を濃縮精製後、抽出したRNAの導入によりIFNとISGsの誘導を評価したが、誘導は認めなかった。

[藤田めぐみ、菅野美津子(東芝RDC)、吉村斉湖(東芝RDC)、杉山奈央、村山麻子、脇田隆宇、加藤孝宣]

(18) ビタミンDおよびその代謝産物がHCVの複製増殖に与える影響の解析

最近、慢性C型肝炎のIFN治療においてビタミンD(VD)を併用することで治療効果が向上することが報告されている。しかし、VD投与の抗HCV作用については明らかではない。そこで、VDとその代謝産物の抗HCV作用について培養細胞での感染増殖系を用い検討を行った。その結果、VDには抗HCV作用は認めず、その代謝産物である25(OH)VDに抗HCV作用があることが明らかになった。

[松村卓哉(昭和大)、井廻道夫(昭和大)、杉山奈央、村山麻子、政木隆博、藤田めぐみ、脇田隆宇、加藤孝宣]

(19) ビタミンD代謝産物である25(OH)VDの抗HCV作用の解析

ビタミンD(VD)の肝臓での代謝産物である25(OH)VDに抗HCV作用が有ることがわかった。そこで、その作用機序について培養細胞にて解析を行った。その結果、この25(OH)VDはHCVの感染や細胞内での複製には影響を与えず、細胞内での感染性ウイルス粒子形成を阻害していることが明らかになった。今後、25(OH)VDは新しい抗HCV薬として使用できる可能性が示された。

[松村卓哉(昭和大)、井廻道夫(昭和大)、杉山奈央、村山麻子、政木隆博、藤田めぐみ、脇田隆宇、加藤孝宣]

(20) ビタミンD代謝産物である25(OH)VDに対する耐性変異株の誘導

ビタミンD(VD)の肝臓での代謝産物である25(OH)VDに抗HCV作用が有ることがわかった。そこで、その25(OH)VDに対する耐性変異株を誘導するため、HuH-7細胞にHCV JFH-1株を導入し、25(OH)VDを1 μ Mで処理し長期培養を行った。その結果、培養25日目頃より培養上清のHCVコア抗原量の増加を認め、耐性変異株が誘導されていると考えられた。増殖して

いるHCV株の全ORFをシーケンスしたところ、NS3のヘリカーゼ領域に1カ所の非同義置換を同定した。

[松村卓哉(昭和大)、井廻道夫(昭和大)、杉山奈央、村山麻子、政木隆博、藤田めぐみ、脇田隆宇、加藤孝宣]

(21) コア領域のアミノ酸変異がHCVの複製に与える影響の解析

HCVコア領域アミノ酸70及び91の変異は、インターフェロン治療に対する抵抗性と肝発癌に関与していることが知られているが、その機序の詳細は不明である。そこでHCV genotype 1b株の構造領域を持ったキメラウイルスを用いてHCVの複製・粒子形成・IFN感受性に与える影響を検討した。その結果、コア領域アミノ酸70番の変異は細胞内での感染性ウイルス生成を低下させHCV蛋白質の細胞内への蓄積を引き起こしていた。この細胞内へのHCVの蓄積がIFN感受性と肝発癌に関与している可能性が考えられた。

[藤田めぐみ、杉山奈央、村山麻子、脇田隆宇、加藤孝宣]

(22) HCV RNA測定法とコア抗原測定法の相関についての検討

HCVのウイルス量測定法評価のため、日本赤十字社よりHCV陽性検体の供与を受けパネル検体を作製した。このパネル検体を用い、HCV RNAおよびコア抗原定量法によりウイルス量を測定し、測定値の分布と相関について検討した。その結果、HCVコア抗原定量法の中でその測定値がHCV RNA定量の結果と乖離する例が数検体認められた。これらの検体のコア領域の塩基配列を比較検討した結果、コア抗原量の測定値に影響を与える領域として、コア領域のaa 47 - 49のアミノ酸変異が同定された。この領域に2つのアミノ酸変異を認めた検体では、HCV RNA量との相関から推定されるコア抗原量の期待値の1/10程度の値を示した。

[村山麻子、杉山奈央、政木隆博、渡士幸一、鈴木亮介、相崎英樹、鈴木哲朗(浜松医大)、水落利明(血液安全性研究部)、脇田隆宇、加藤孝宣]

(23) HCV院内感染における感染源同定についての検討

某医療施設より院内感染が疑われるC型急性肝炎患者について、感染源となり得る他の患者血清中のHCVと遺伝子配列比較の依頼があり検討を行った。急性感染を発症した患者血

清, および感染源となり得ると考えられた他の患者2例の血清からRNAを抽出し, HCV コア領域に設定したプライマーを用い PCR を行った. 増幅されたフラグメントのシーケンスの結果, これらの患者に感染している HCV は相同性が低く, これらの患者間で感染が起こった可能性は低いと考えられた.

[杉山奈央, 脇田隆宇, 加藤孝宣]

(24) HCV 遺伝子型 3a を用いた抗 HCV 阻害剤の作用の検討
遺伝子型 3a (S310) と遺伝子型 2a (JFH-1/4-1) のサブジェノミックレプリコンを使用し, 抗 HCV 阻害剤の薬剤効果を検討した. ヌクレオシド NS5B ポリメラーゼ阻害剤 PSI-6130 とインターフェロンを添加した細胞では遺伝子型 2a と遺伝子型 3a の場合, いずれも感受性がみられた. 一方, NS3 プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 を添加した細胞では, 遺伝子型 3a では非感受性であったが遺伝子型 2a では感受性であった, 非ヌクレオシド NS5B ポリメラーゼ阻害剤 JTK-109 で処理した結果, 遺伝子型 2a では非感受性であったが, 遺伝子型 3a では阻害作用が見られた. 以上の結果から, それらの遺伝子型を使用することで臨床の効果を予測することが期待できると考えられた.

[ススムエー, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(25) 全長 JFH-1/Con1 キメラウイルスの作製とウイルス粒子産生の検討

遺伝子型 2a の JFH1 株の非構造タンパク質である NS5B の 470 アミノ酸を遺伝子型 1b の con1 株のアミノ酸に置換した JFH1/NS5B_{con1} キメラプラスミドを作製し, 合成した RNA を Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし, 細胞内と上清中の HCV core を測定したが増殖が認められなかった.

[ススムエー, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(26) JFH1/con1 mutant キメラウイルスの作製と粒子の産生に関する適応変異の同定

ネオマイシン耐性遺伝子を持つ遺伝子型 2a の JFH1 株サブジェノミックキメラレプリコンの NS5B を遺伝子型 1b の con1 株の NS5B と置換したキメラレプリコンを作製し, コロニー形成アッセイを行った. JFH-1 株の NS5B に con1 株の NS5B を置き換えた全長キメラに, 得られた NS5A と NS5B の変異を導入したコンストラクトを作製した. 適応変異を導入することでより粒子産生ができ, 感染効率の良い遺伝子型 2a/1b の全長のキメラ

ウイルスが得られた. 以上から, NS5A と NS5B の適応変異が複製に重要なことが明らかになった.

[ススムエー, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(27) C 型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析

HCV の trans-complemented particles (HCVtcp) を用いて, Huh7 細胞と Huh7.5.1 細胞への HCV の侵入機構を, エンドサイトーシス経路に関与する宿主因子のノックダウンにより解析した. Huh7 細胞および Huh7.5.1 細胞へは, レセプターを介した pH 依存性エンドサイトーシス経路により侵入することが確認されたが, Huh7.5.1 細胞への侵入には, クラスリンに依存性しない未知のエンドサイトーシス経路の存在が示唆された.

[松田麻未, 鈴木亮介, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆宇]

(28) トランスパッケージング型 HCV 粒子産生系の開発

HCV のトランスパッケージング型粒子 (HCVtcp) は, 本来の HCV と同様の粒子構造を持つと考えられ, シュードタイプウイルスに比べて HCV により近い細胞侵入様式を示す 1 回感染性粒子であることから, 感染初期過程の解析に適している. この HCVtcp 産生系を, レプリコンのゲノムの改変や, 感染性粒子形成能を高める NS3 領域中の新たな適応変異を同定する事によりさらに効率を高め, 複数の遺伝子型の HCVtcp 粒子の産生に成功した.

[鈴木亮介, 斎藤憲司, 鈴木哲朗 (浜松医大), 斎藤 泉 (東大), 鐘ヶ江裕美 (東大), 相崎英樹, 脇田隆宇]

(29) 昆虫細胞を用いた virus like particle (VLP) の産生

S2 細胞に JFH-1 株のコア領域 (1-191) を発現させ, 上清中のコアタンパク量を測定したところ, 培養上清中に放出されていることがわかった. それらの性状を解析するため, ショ糖密度勾配法で分画を行い, コアタンパク質の密度を測定したところ 1.06g/ml を示し, Triton X-100 処理することで 1.15 g/ml を示した. これは Triton 処理で脂質が除かれたことで密度が変化したと考えられ, 脂質との親和性が高いコアタンパク質の特徴を表す結果であると言える.

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(3 0) HCV ライフサイクルにおける E2 糖鎖の役割

NQ 変異 (Asn を Gln に置換) してもウイルスの生活環に影響のない E2 の糖鎖修飾部位アミノ酸の 4 部位 (N1, N5, N6, N9) について変異を同時に組み合わせることは可能なかを調べた。2 部位, 3 部位で組み合わせたとこ、72 時間後のコアの放出については大きな変化はなかったが、感染性について調べたところ、N1 と N6 を同時に置換した組み合わせでは感染性が著しく減少した。

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(3 1) E2dHVR タンパク質の機能解析

E2 タンパク質の Hyper variable region (HVR) の機能を解析するために、drosophila S2 細胞を用いて E2dHVR タンパク質 (411-714) の産生、精製を行った。S2 細胞に発現させてウエスタンブロットにて 45kDa のバンドを検出した。アフィニティー精製を行い、銀染色で E2dHVR タンパク質の精製度を確認して E2 タンパク質と同様に単量体の割合が高いことを確認した。E2dHVR タンパク質を用いて HCVcc の感染阻害実験を試みた。その結果、E2dHVR は感染阻害活性を有していなかった。

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(3 2) E2 タンパク質の中和抗体誘導について

S2 細胞を用いて作製した E2 タンパク質は、マウスに免疫することで E2 抗体を誘導するが、HCVcc の感染実験で中和活性を示さなかった。S2 細胞で作製した E2 タンパク質は感染阻害をすることから正常な立体構造を有していると考えられ、この構造が中和エピトープを隠している。つまり HVR 配列が中和エピトープを塞ぐ構造をとると予想し、S2 細胞で作製した E2dHVR タンパク質で免疫を試みた。その結果、E2dHVR タンパク質でも中和抗体は誘導されず、HVR 以外の構造が重要であると考えられる。

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(3 3) HCV の粒子形成に重要な HCV NS2 結合宿主因子の同定とその作用メカニズム

分割ユビキチン法を利用した酵母 two hybrid システムにより、HCV NS2 と結合する宿主因子をスクリーニングし、さらにそれらの宿主因子の発現を、siRNA を用いてノックダウンさせる事により、ウイルスの増殖に重要な役割を担う宿主因子を

同定した。この因子が HCV の生活環のどの過程に、どのようなメカニズムで関与しているのかを明らかにした。

[鈴木亮介, 鈴木哲朗 (浜松医大), 松田麻未, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(3 4) HCV-NS5A 蛋白に結合し HCV 産生に関与する宿主因子の同定

NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS5A に結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、および siRNA screening を行ったところ、翻訳、複製過程に関与している蛋白として ELVL1 を見出し、そのメカニズムについて解析した。

[後藤耕司, 山越 智 (生物活性物質部), 小池和彦 (東大消化器内科), 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 相崎英樹, 脇田隆宇]

(3 5) HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

脂肪滴周辺膜のプロテオーム解析および siRNA によるスクリーニングで、HCV 粒子形成に関与する生体膜蛋白として HSD11 を見出した。HSD11 は NS5A に結合し、NS5A を脂肪滴上に導く作用が示された。

[相崎英樹, 深澤征義 (細胞化学部), 花田賢太郎 (細胞化学部), 本島清人 (明治薬科大学), 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 脇田隆宇]

(3 6) HCV 感染細胞のメタボローム解析

HCV 感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、HCV 感染細胞の代謝物質の網羅的解析 (メタボロミクス) を行ったところ、蛋白核酸合成等は低下し、エネルギー代謝は更新、および解糖系は著明に亢進していた。代謝変化のメカニズムの解明を目指し、構造蛋白を恒常的に発現する細胞株、サブゲノムレプリコン細胞でも同様のメタボロミクス解析を行っている。

[松田麻未, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆宇]

(3 7) グリチルリチンの C 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析

グリチルリチンは慢性 C 型肝炎患者に用いられているが、その抗 HCV 作用については不明である。そこでグリチルリチンの抗 HCV 作用について検討した。その結果、HCV 生活環の複数を

テップにおいて効果が認められ、特に感染性粒子放出において強い阻害効果を示した。今後、グリチルリチンの抗HCV作用の分子メカニズムの解析を行う。

[松本喜弘, 相崎英樹, 松浦知和 (慈恵医大), 和気健二郎 (ミノファージェン製薬), 脇田隆字]

(38) halopemideによる感染性HCV産生抑制機構の解析

化合物スクリーニングにより、感染性HCV産生を低下させるものとして halopemide を同定した。この化合物は会合から放出に至るHCV生活環後期過程を阻害すると考えられたが、その詳細な抗HCVメカニズムを解析している。

[内田奈々子, 渡士幸一, 脇田隆字]

(39) シクロフィリン阻害剤の抗HCV機構の解析

シクロフィリン阻害剤はHCV NSタンパク質機能を修飾することによりHCV RNA複製を直接阻害することが知られているが、シクロフィリン阻害剤のこれ以外の機能を、HCV粒子産生系を用いて調べている。

[大東卓史, 渡士幸一, 脇田隆字]

(40) HCV複製細胞におけるATP局在の解析

生細胞内のATP濃度を可視化するプローブ(ATeam)を用いた解析で、HCV複製細胞の細胞質におけるATP濃度は2 mMから1 mMに半減する一方、複製複合体と考えられる顆粒状の発現部位は5 mMと大幅に亢進していることを確認した。複製阻害剤を添加したところ、10分間の阻害では細胞質/顆粒部分ともにATP濃度が亢進した。2時間阻害した場合、どちらも非複製細胞同等レベルまで低下した。HCV複製細胞におけるATP分布の攪乱はHCV複製に関連していることが示された。

[安東友美, 今村博臣 (京大), 鈴木亮介, 相崎英樹, 脇田隆字, 鈴木哲朗 (浜松医大)]

(41) HCV複製細胞におけるATP制御機構の解析

HCV複製複合体におけるATP濃度の亢進メカニズムを考察するために、ATP濃度を可視化するプローブ(ATeam)を融合したHCV複製系を発現させた細胞の、活性化状態にあるミトコンドリアを染色した。高いATP濃度を示す顆粒状の発現部位は、活性化状態にあるミトコンドリアと近接していた。ミトコンドリアからHCV複製複合体への直接的なATP流入の可能性が示唆

された。

[安東友美, 今村博臣 (京大), 鈴木亮介, 相崎英樹, 脇田隆字, 鈴木哲朗 (浜松医大)]

(42) 薬剤感受性予測因子のウイルスゲノム上での存在様式

昨年度までに血清中に存在するHCVゲノム配列を全長にわたり決定する手法を開発した。これを用いてHCV陽性患者の血清を経時的に解析し、それぞれ3種類の独立したウイルスゲノム配列を決定した。インターフェロンに対する治療感受性予測因子として報告されているcore 70番のアミノ酸とNS5Aに存在するIRRDR領域について、感受性予測因子が同一のウイルスゲノム上に共存することを初めて確認した。

[安東友美, 相崎英樹, *杉山真也, *溝上雅史, **関塚剛史, **黒田 誠, 脇田隆字 (*国立国際医療センター, **病原体ゲノム解析研究センター)]

(43) 患者血清内に共存するウイルスゲノムの系統樹解析

HCV陽性患者の血清を経時的に解析し、それぞれ3種類の独立したウイルスゲノム配列を決定した。近縁なHCVゲノム配列をデータベース上から選択し併せて系統樹を作成したところ、患者由来の全ての配列が単一のクラスターを形成したことから、複数回感染の機会があったわけではないことが示唆された。その中でインターフェロンに対する感受性予測因子を持つゲノム配列あるいは持たないゲノム配列は、それぞれ単一のクラスターを形成した。感受性株と非感受性株が、患者内で独立して進化している可能性が示唆された。

[安東友美, 相崎英樹, 脇田隆字]

(44) クロマトグラフィー法を用いたC型肝炎ウイルス粒子精製方法の検討

HCVワクチンを開発するためにHCV粒子の細胞培養上清からの効率的な分離精製が大きな課題となっている。そこでスケールアップが容易な精製方法として、クロマトグラフィー法を用いたHCV粒子の精製方法を考案し、その精製効率を検討した。

[横川 寛, 森山正樹, 赤澤大輔 (東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(45) 動物モデルを用いたC型肝炎ウイルス粒子ワクチンの安全性および免疫誘導効果の検討

培養細胞由来HCV粒子を免疫抗原とする不活化HCV粒子ワクチンの有用性を評価するために、マウスにおいて抗体産生を中心としたB細胞の免疫誘導能について、またCD4 T細胞およびCD8 T細胞に対する免疫誘導能について検討した。さらに、ヒトにより近縁であるマカク属サルを用いてHCV粒子ワクチンの安全性と免疫誘導能を評価した。

[森山正樹, 横川 寛, 赤澤大輔 (東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

4. E型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

(1) HEVの細胞吸着・侵入過程を規定する宿主因子の探索

HEV感染に感受性または非感受性のPLC/PRF/5サブクローン細胞がそれぞれ複数樹立され、細胞内複製に問題がないことが確認されてきた。更に、感受性と細胞表面のHEV結合分子の存在には必ずしも相関がないことが判明した。つまり、複数の非感受性サブクローンの存在は、複数の吸着・侵入過程関連宿主因子の存在を示唆している。これら関連因子を同定するため、感受・非感受性サブクローンの二次元電気泳動比較解析に続き、相違構成因子に対する質量分析を行って、複数の感染性規定宿主因子の候補を同定した。更に、マイクロアレイ比較解析を実施し、前者の知見と総合して吸着・侵入過程への関連を解析している。

[塩田智之, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

(2) HEV生活環における構造蛋白C端領域の必須性

HEV ORF2のC端52アミノ酸は、組換えバキュロウイルスを用いた解析では粒子形成には必須でないことが判明している。本領域をdeletionされたRNAには全く増殖性がなく、stop codon (TAA)の導入により欠損させたRNA (*amut*)には、一過性のORF2分泌能が確認された。*amut*の粒子形成を確認するため、上清を濃縮・密度勾配遠心した結果、野生株と同一分画に不完全復帰変異体 (GTT 他)が見いだされた。更に、長期観察時には、一過性増殖後に完全復帰変異体 (GTC)の増殖が確認された。つまり、当該領域はHEV生活環において必須である。

[塩田智之, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

(3) HEV構造蛋白C端領域のウイルス粒子形成への役割

野生株とのprogeny産生量の比較によって、*amut*には3桁以上のRNAパッケージング効率の低下が推定された。経時的な遺伝子解析によって判明した復帰変異体出現以前での大量培養によって、*amut*のパッケージングを確認した。蛋白質配列・免疫学的解析から、*amut*粒子のC端側での更なるプロセシングが示唆された。また、大半の*amut*粒子が、感染性の無いRNA取込み異常粒子であることが確認された。つまり、C端52アミノ酸は正確なパッケージングを促進し、粒子の安定性を向上させている。

[塩田智之, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 武田直和 (阪大微研, 日本・タイ感染症共同研究センター), 脇田隆字]

(4) HEVの非構造蛋白中の複製能を規定する残基の解析

HEVの構造蛋白(ORF1)に変異を導入し、ウイルスの増殖性への影響を調べた。その結果、1つのアミノ酸変異のみで複製能を喪失するアミノ酸を複数同定した。これらのアミノ酸残基はHEVの複製に重要な働きを担っていると推察される。また、システインプロテアーゼの活性中心のシステインに変異を導入すると複製能がなくなることから、本プロテアーゼはウイルス複製に必須であることが示された。今後、複製能を喪失するアミノ酸変異が及ぼしている影響について解析する。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

(5) HEVのレプリコン構築の試み

HEVの複製機構を解析するためにレプリコンの構築を試みた。HEVの感染性クローンの構造蛋白を発現するORF2領域を、HCV IRESとその下流に各種レポーター遺伝子を連結したもので置換した。全長RNAを合成してPLC/PRF/5細胞に導入してレポーター遺伝子の発現の確認を行っている。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

(6) 不活化E型肝炎ワクチンの検討

培養細胞で増殖した遺伝子型G1, G3, G4のHEVを65°C, 10分間熱処理した後、それぞれをウサギとラットに3回ずつ大腿筋に接種した。接種後、経時的に採血してELISA法でHEVに対する抗体を測定し、さらに免疫血清の中和活性を測定し

た。熱処理によって不活化した各遺伝子型の HEV をウサギ、ラットに接種すると血中に抗 HEV IgG 抗体が誘導された。抗体価は 1:1,600~25,600 であり、遺伝子型間に抗体価の差が多少見られた。これらの抗体は HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を阻止した。この結果は、不活化 HEV によって誘導された抗体が中和活性を持つことを示唆する。現在ウイルスの精製条件を検討し、サルを用いて不活化ワクチンの効果を観察している。

[李 天成, *網 康至, *須崎百合子, **武田直和, 脇田隆宇 (*動物管理室, **大阪大学微生物病研究所, 日本・タイ感染症共同研究センター)]

(7) Genotype 5 および 6 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて Genotype 5 (G5 HEV) および Genotype 6 HEV (G6 HEV) の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析を試みた。G5 および G6 HEV ORF2 を RT-PCR 法で増幅し、定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを用い Tn5 細胞で構造蛋白を発現させ、ウイルス様粒子 (HEV-LPs) を作製した。HEV-LPs をウサギとモルモットに免疫し、抗 HEV-VLPs 抗体を獲得した。HEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を樹立し、G5 および G6 HEV の抗原性を従前既知の G1, G3, G4 HEV の抗原性と比較した。その結果は G5 と G6 HEV の抗原性が G1, G3, G4 HEV と非常に類似するし、抗 G5, G6 HEV 抗体は G3HEV の培養細胞への感染を阻止した。

[李 天成, *高橋和明, **片岡紀代, 吉崎佐矢香, ***網 康至, ***須崎百合子, 石井孝司, 脇田隆宇, *三代俊治 (*東芝病院, **感染病理部, ***動物管理室)]

(8) ラット HEV 疫学調査

日本およびベトナムの野生ラットから血清を採取し、ELISA 法を用いて抗ラット HEV IgG および IgM を検査した。さらに IgM 陽性の血清に対して RT-PCR 法によるラット HEV 遺伝子検査を実施した。その結果、ベトナム野生ラットの抗体保有率は 20% であり、HEV RNA 陽性例も存在していることが判明した。日本野生ラットにおける抗体保有率は 16% であったが、Rat HEV 陽性検体が見つからなかった。

[李 天成, *安田俊平, *吉松組子, *有川二郎, 脇田隆宇 (*

北海道大学)]

(9) ラット HEV 全長ゲノムのクローニング及び配列の解析

Rat HEV RNA 陽性であるベトナム野生ラット肺組織の 10% 乳剤を尾静脈内から実験用ラット (Wistar) に接種し、経時的に採血と採便をし、ウイルス遺伝子を測定した。Rat HEV RNA 陽性便サンプルから RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて Rat HEV 全長配列の増幅に成功した。塩基及びアミノ酸の解析により、ベトナム野生ラット由来の rat HEV はこれまで報告されたもののホモロジーは 77% にとどまり、新しい遺伝子型であることが示唆された。

[李 天成, *網 康至, *須崎百合子, **武田直和, 脇田隆宇 (*動物管理室, **大阪大学微生物病研究所, 日本・タイ感染症共同研究センター)]

(10) E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性

ラット HEV は遺伝子構造上ではヒト HEV と類似するウイルスであり、その病原性やヒトへの感染性などの情報が少なく、ヒト由来 HEV がラットに感染するかどうかについてもいまだ明らかになっていない。本実験ではヒト HEV, ラット HEV に対するラットの感受性を感染実験で確認し、新しい動物モデルを見いだすことを目的として、Genotype 1, 3, 4 HEV およびラット HEV をラット尾静脈内から接種し、経時的に採血と採便を行った。血液中のウイルス抗原、特異抗体、ウイルス遺伝子、ALT/AST および、便中のウイルス抗原、抗体、およびウイルス遺伝子を測定しウイルスの感染の有無を評価した。その結果は Genotype 1, 3, 4 HEV はラットに感染しないが、Rat HEV は実験用ラットへの感染が成立した。

[李 天成, *網 康至, *須崎百合子, 脇田隆宇 (*動物管理室)]

(11) ラット HEV 粒子形成に必要な領域の同定

ラット HEV ORF2 の N 末端から 100 アミノ酸を欠失させた構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約 24nm と 35nm の二種類の中空粒子が産生される。アミノ酸配列解析によって、この粒子蛋白は N 末端の 100 個のアミノ酸以外に C 末端から一部のアミノ酸が欠失していた。構造蛋白の N 末端、あるいは C 末端、さらに両端を欠失した種々のクローンを発現し、VLP 形成に必要な領域の同定を試みていた。N 末端から

100個のアミノ酸を欠失させた上に、C末端から593番目まで52個のアミノ酸を欠損させても粒子の形成には影響を与えなかったが、これ以上欠失させると粒子は形成されなくなった。したがって、粒子形成にはC末端より593番目のアミノ酸までが必須であった。N末端の解析は進行中である。

[李 天成, 片岡紀代 (感染病理部), 脇田隆宇]

(12) 中国広州におけるラット疫学調査

これまでに Rat HEV はドイツ, アメリカ, ベトナムから分離された。rat HEV の感染は世界範囲に広がっている可能性がある。今回我々, 中国広東省で野生ラットの血清及び糞便検体を採取し, ELISA 法を用いて抗ラット HEV IgG および IgM を検査した。これまでに 169 血清検体を検査した結果 32 検体は抗体陽性であり, 抗体保有率は 18.9%であった。これから, さらに検体を採取し, rat HEV 遺伝子を検査して新しい遺伝子型の存在の有無を同定する。

[李 天成, *黎 薇, *柯 昌文, 脇田隆宇 (*中国広東 CDC)]

(13) サル由来 HEV の感染性および全長配列の解析

最近我々はニホンザルから一株の HEV (M-HEV) を分離したが, M-HEV の感染性や病原性などは明らかにされていない。M-HEV の感染性および病原性を解析するため, このウイルスを二頭のカニクイザルに接種し, サル由来 HEV の感染性や病原性などを検討した。M-HEV が含まれるサル糞便乳剤を 45 μ m フィルターで濾過した後, 静脈からカニクイザルに接種し, 経時的に採血と採便を行い, ウイルス抗原遺伝子および ALT/AST を経時的に測定してウイルスの感染性を評価した。その結果, 血液および便からウイルス遺伝子が検出され, 血中に抗 HEV IgG, IgM 抗体が検出され, このウイルスが感染性を有することが明らかになった。現在, M-HEV の全長配列は解析され, G3 に属することが明らかになった。

[李 天成, *網 康至, *須崎百合子, 脇田隆宇 (*動物管理室)]

IV. その他のウイルスに関する研究

(1) ヒトポリオマーウイルス TSV のウイルス様粒子の作製およびその応用

TSV は最近免疫欠損患者の皮膚から分離された新しいポリオマーウイルスである。現在まで TSV の増殖細胞系は確立さ

れておらず, TSV の複製や粒子構造などは明らかにされていない。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いて TSV のウイルス様粒子 (VLP) の作製, 精製を試みた。組換えバキュロウイルス感染細胞では TSV VP1 蛋白が産生され, 培養上清に放出された。培養上清から直径約 20nm と 50nm の二種類の球形粒子構造が電子顕微鏡で観察された。この VLP を用いて TSV 抗体検出 ELISA 法を樹立した。372 人健常日本人血清を調べた結果, 日本における TSV 抗体保有率は 50%であることが明らかになった。

[李 天成, 片岡紀代 (感染病理部), 脇田隆宇, 鈴木哲朗 (浜松医大)]

<別>

第1室:

承認前検査

(1) 弱毒生ロタウイルスワクチン (ロタリックス) の承認前検査

[村上耕介, 戸高玲子, 朴 英斌, 片山和彦, 脇田隆宇]

(2) 弱毒生 5 ロタウイルスワクチン (5 価) のロタテック承認前検査

メルク萬有社が申請したロタウイルスワクチン (ロタテック) の承認前検査を実施した。

[藤井克樹, 下池貴志, 村上耕介, 戸高玲子, 朴 英斌, 片山和彦, 脇田隆宇]

(3) 不活化ポリオワクチン (ソークワクチン) の承認前試験

サノフィパスツール社が申請した不活化ポリオワクチン (ソークワクチン) の承認前試験を行った。

[染谷雄一, 白土東子, ハンスマン・グラント, 朴 英斌, 片山和彦, 脇田隆宇]

(4) DPT-sIPV 化血研 (クアトロバック) の承認前検査

[染谷雄一, 白土東子, 朴 英斌, 下池貴志, 白土東子, 村上耕介, 藤井克樹, 戸高玲子, 他ウイルス第二部職員, 片山和彦, 脇田隆宇]

(5) DPT-sIPV 化血研 (テトラビック) の承認前検査

[染谷雄一, 白土東子, 朴 英斌, 下池貴志, 村上耕介, 藤井克樹, 戸高玲子, 他ウイルス第二部職員, 片山和彦, 脇田隆宇]

第2室：

平成23年度は8件の行政検査依頼があり、ウイルス分離同定、塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した。ポリオ感染源調査由来糞便検体から長野県で分離されたポリオウイルス分離株抽出 RNA について、ポリオウイルス同定リアルタイム RT-PCR を行ったところ、ポリオウイルス 2 型 (Sabin-like) と同定され、塩基配列解析の結果、ポリオウイルス 2 型ワクチン株と同定された。他のポリオウイルス分離株は、型内鑑別あるいは塩基配列解析の結果、すべてワクチン株と同定された。

第3室：

行政検査

C型肝炎 1件

行政検査として岡山市より HCV 遺伝子配列同定の依頼があった。院内感染が疑われる C 型急性肝炎の症例と、その感染源の可能性のある慢性 C 型肝炎症例の血清より RNA を抽出し、RT-PCR 法にて HCV ゲノムを増幅した後に塩基配列を比較検討した。その結果、得られた HCV ゲノムの配列は相同性が乏しく、院内感染とは考えにくい結果であった。

第5室：

検定業務

(1) A型肝炎ワクチン及びB型肝炎ワクチンのサマリー・ロット・プロトコル (SLP) の作成

A型肝炎ワクチン1社、B型肝炎ワクチン2社の SLP を作成した。現行の自家試験記録に加えて各処理日付・温度等の製造工程パラメーターや工程管理試験の結果も検討できるように考慮した。現在、A型肝炎ワクチンとB型肝炎ワクチンそれぞれ1社が SLP 様式を用いた試行に入っている。残る1社についても試行期間中に最低1ロット分の SLP 提出が見込まれている。

検定業務

乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン 2件

組換沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来) 5件

行政検査

A型肝炎 10件

E型肝炎 7件

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Matsuhira T, Kaji C, Murakami S, Maebashi K, Oka T, Takeda N, Katayama K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim* 61(1): 35-40, 2012.
- 2) Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. *Antiviral Research* 90(1): 9-16, 2011.
- 3) Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol* 157(2): 349-52, 2012.
- 4) Kitaura K, Fujii Y, Hayasaka D, Matsutani T, Shirai K, Nagata N, Lim CK, Suzuki S, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. High clonality of virus-specific T lymphocytes defined by T cell receptor usage in the brains of mice infected with West Nile virus. *J Immunol* 187: 3919-30, 2011.
- 5) Matsutani T, Fujii Y, Kitaura K, Suzuki S, Tsuruta Y, Takasaki T, Ogasawara K, Nishimoto N, Kurane I, Suzuki R. Increased positive selection pressure within the complementarity determining regions of the T-cell receptor beta gene in New World monkeys. *Am J Primatol* 73: 1082-1092, 2011.
- 6) Fujii Y, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. T cell clones expressing different T cell receptors accumulate in the brains of dying and surviving mice following peripheral infection with Far Eastern strain of tick-borne encephalitis virus. *Viral Immunology* 24:291-302, 2011.
- 7) Someya Y, Shirato H, Hasegawa K, Kumasaka T, Takeda N. Assembly of homogeneous norovirus-like particles accomplished by amino acid substitution. *J Gen Virol* 92(10): 2320-2323, 2012.
- 8) Someya Y. From head to toe of the norovirus 3C-like protease. *BioMol Concepts* 3(1): 41-56, 2012.
- 9) Shirato H: Norovirus recognition sites on histo-blood group antigens. *Frontiers in Virology* 3: 177, 2012.
- 10) Sakaidani Y, Nomura T, Matsuura A, Ito M, Suzuki E, Murakami K, Nadano D, Matsuda T, Furukawa K, Okajima T: O-Linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nature Communications*, 2: 583, 2012.
- 11) Hansman GS, Shahzad-Ul-Hussan S, McLellan JS, Chuang GY, Georgiev I, Shimoike T, Katayama K, Bewley CA, Kwong PD. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J Virol* 86: 284-92, 2012.
- 12) Hansman GS, Taylor DW, McLellan JS, Smith TJ, Georgiev I, Tame JR, Park SY, Yamazaki M, Gondaira F, Miki M, Katayama K, Murata K, Kwong, PD. Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J Virol* 86(7): 3635-46, 2012.
- 13) De W, Huanying Z, Hui L, Corina M, Xue G, Leng L, Hanri Z, Ling F, Yanling M, Huiqiong Z, Huan Z, Jing K, Caiyun L, Yoshida H, Changwen K. Phylogenetic and molecular characterization of Coxsackievirus A24 variant isolates from a 2010 acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak in Guangdong, China. *Virology J* 9: 41, 2012.
- 14) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012.
- 15) Kataoka C, Kaname Y, Taguwa S, Abe T, Fukuhara T, Tani H, Moriishi K, Matsuura Y. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. *J Virol* 86: 2610-20, 2012.
- 16) Nishimura Y, Shimizu H: Cellular receptors for human enterovirus species A. *Front Microbiol* 3: 105, 2012.

- 17) Sasaki J, Ishikawa K, Arita M, Taniguchi K. ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J* 31: 754-766, 2011.
- 18) Jiang H, Weng L, Zhang N, Arita M, Li R, Chen L, Toyoda T. Biochemical characterization of enterovirus 71 3D RNA polymerase. *Biochim Biophys Acta* 1809: 211-219, 2011
- 19) Arita M, Iwai M, Wakita T, Shimizu H. Development of poliovirus neutralization test with poliovirus pseudovirus for measurement of neutralizing antibody titer in human serum. *Clin Vaccine Immunol* 18: 1889-1894, 2011.
- 20) Arita M, Masujima S, Wakita T, Shimizu H. Particle Agglutination Method for Poliovirus Identification. *J Vis Exp* 50, doi: 10.3791/2824, 2011.
- 21) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996-2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells. *Jpn J Infect Dis* 64: 167-168, 2011.
- 22) Iwai M, Horimoto E, Obara M, Obuchi M, Kurata T, Kawagoshi K, Nakamura S, Shimizu H, Yoshida H, Takizawa T: Endemic transmission of echovirus 30 in Toyama, Japan in 2010 is verified by environmental surveillance. *Jpn J Infect Dis* 64: 165-167, 2011.
- 23) Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T: Production of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. *J Virol* 86(4): 2143-2152, 2012.
- 24) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem* 286: 37264-37273, 2011.
- 25) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 54: 425-433, 2011.
- 26) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 410: 404-409, 2011.
- 27) Tomomi Ando, Hiromi Imamura, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Toshiki Watanabe, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathogens* 8(3): e1002561, 2012.
- 28) Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F. Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. *PLoS One* 6: e18285, 2011.
- 29) Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 415: 714-719, 2011.
- 30) Winkelmann ER, Widman DG, Suzuki R, Mason PW. Analyses of mutations selected by passaging a chimeric flavivirus identify mutations that alter infectivity and reveal an interaction between the structural proteins and the nonstructural glycoprotein NS1. *Virology* 421: 96-104, 2011.
- 31) Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 92: 2082-7, 2011.

- 32) Li TC, Ochiai S, Ishiko H, Wakita T, Miyamura T and Takeda N. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. *Travel Med Infect Dis* 10(2): 80-85, 2012.
- 33) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai LT, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T. Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J Gen Virol* 92: 2830-2837, 2011.
- 34) Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee YJ, Saito A, Funai H, Kimura N, Ageyama N, Yoshizaki S, Suzuki T, Yasutomi Y, Miyamura T, Kannagi M, Akari H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Front Microbiol* 2: 240, 2011.
- 35) Ishii K, Miyamura T, Kanda T, Tawada A, Sekimoto T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Kiyohara T, Wakita T, Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatol Res* 42: 248-253, 2012.
- 36) Ishii K, Li TC, Yoshizaki S, Shiota T, Kato T, Takeda N, Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepato Inter* 6: 292, 2012.
- 37) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Wakita T, Shimada T, Nakamura N, Nakashima K, Tada Y, Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *J Clin Virol* 53: 219-224, 2012.
- 38) Yoshida T, Miyasaka T, Azegami Y, Uchiyama Y, Kasahara H, Ueda H, Nagase H, Fujita S, Ishii K, Noda M. Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. *Jpn J Infect Dis* 64: 260-261, 2011.
- 39) Li TC, Song S, Yang Q, Ishii K, Takeda N, Wakita T. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepato Inter* 5: 202, 2011.
- 40) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Shimada T, Nakamura N, Tada Y, Noda M, Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepato Inter* 5: 204-205, 2011.
- 41) Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 6(10): e26620, Epub Oct 25, 2011.
- 42) Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 7(10): e1002289 2011.
- 43) Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnogli SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes Infect* 14(1): 69-78, 2012.
- 44) Tamura R, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Fujiwara K, Saito K, Roger T, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C Virus nonstructural 5A protein inhibits lipopolysaccharide-mediated apoptosis of hepatocytes by decreasing expression of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis* 204(5): 793-801, 2011.
- 45) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C. *Liver Int*. 31(6): 871-80, 2011.
- 46) Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, Moriishi K, Seya T, Enomoto N, Koike K, Kato N, Kanto T, Hotta H. Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th international meeting on hepatitis C virus and related viruses. *Gastroenterology* 141(1): e1-5, 2011.

- 47) Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Sharkar M, Tagawa Y, Uezato T, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N. Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. *Biomed Res* 32(2): 143-50, 2011.
- 48) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S. Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 141(1): 128-40, 140. e1-2, 2011.
- 49) Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 6(6): e21284, 2011.
2. 和文発表
- 1) 藤井克樹, 片山和彦: IASR 特集, ロタウイルス感染症.
- 2) 増本久人, 南 亮仁, 野田日登美, 江口正宏, 古川義朗, 鶴田清典, 中田恵子, 左近 (田中) 直美, 山崎謙治, 高尾信一, Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未, 吉田 弘, 清水博之: 国内外における手足口病流行に関与するコクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析. *病原微生物検出情報* 33: 60-61, 2012.
- 3) 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未, 岡部信彦, 榎本美貴, 小林正明, 吉田 弘, 清水博之: 2011年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルスA6型の遺伝子配列. *病原微生物検出情報* 33: 61-62, 2012.
- 4) 武知茉莉亜, 乾 未来, 福島若葉, 中野貴司, 清水博之: 手足口病・ヘルパンギーナおよび関連合併症の入院症例に関する全国調査 (2010年分) —中間集計結果. *病原微生物検出情報* 33: 63-64, 2012.
- 5) 清水博之: 手足口病 (エンテロウイルス 71) ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012.
- 6) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012.
- 7) 甘利昭一郎, 生田陽二, 小田 新, 滝有希子, 内山健太郎, 吉田知広, 大場邦弘, 野田絵理, 河野寿夫, 清水博之, 水谷哲也: 中枢神経病変を来したコクサッキーウイルス B4 感染症の 7 例. *日本小児科学会雑誌* 115: 1418-1422, 2011.
- 8) 榎本美貴, 高井伝仕, 岡藤輝夫, 飯尾 潤, 田中一宏, 近平雅嗣, 花岡 希, 岡部信彦, 谷口清州, 清水博之, 藤本嗣人: 兵庫県における2010~2011年の手足口病患者からのコクサッキーウイルス A6 の検出状況. *病原微生物検出情報* 32: 196, 2011.
- 9) 高山直秀, 崎山 弘, 岡部信彦, 清水博之, 宮村達男, 梅本 哲: BCG ワクチン, ジフテリア・百日咳・破傷風 3 種混合ワクチン, 経口生ポリオワクチン, 麻疹・風疹混合ワクチン 1 期の全国累積接種率 -2009 年度調査報告. *小児科臨床* 64: 963-971, 2011.
- 10) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入の現状と移行期の問題点. *愛知県小児科医会会報* 95: 14-17, 2012.
- 11) 清水博之: ポリオ. *総合臨床* 60: 2225-2232, 2011.
- 12) 清水博之: Sabin 株由来不活化ポリオワクチン開発の必要性と問題点. *Bio Clinica* 26: 19-23, 2011.
- 13) ナイーム アシフ, 清水博之: ヒトカルジオウイルス感染症. *臨床とウイルス* 39: 132-138, 2011.
- 14) 清水博之: 不活化ポリオワクチン. *日本臨床* 69: 1604-1608, 2011.
- 15) 有田峰太郎: ポストポリオシンドローム. *臨床と微生物* 38: 069-072: 2011.
- 16) 加藤孝宣: HCV 培養細胞モデルの進歩: Replicon, HCVpp, HCVcc. 特集 “C 型肝炎のすべて 2012” *肝胆膵* 63: 899-903, 2011.
- 17) 藤田めぐみ, 加藤孝宣, 坂本直哉: HCV による自然免疫系の抑制機構: NS3, NS4B. 特集 “C 型肝炎のすべて 2012” *肝胆膵* 63: 1107-1111, 2011.
- 18) 田中純子, 小山富子, 相崎英樹: C 型肝炎ウイルス (HCV) による感染. *日本臨床ウイルス学会 臨床とウイルス 臨床とウイルス別冊 日本臨床ウイルス学会* 40: 28-35, 2012.

- 19) 相崎英樹, 脇田隆字: HCV 感染における脂質代謝の変化とメタボロミクス解析, 肝胆臓, 東京, 2011: 948-953.
- 20) 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字: HCV 生活環における脂質の役割, 日本臨床, 日本臨床社, 大阪, 2011: 59-63.
- 21) 鈴木哲朗, 原 弘道, 相崎英樹, 鈴木亮介, 政木隆博: C 型肝炎ウイルスの複製と粒子形成 日本ウイルス学会雑誌ウイルス 60: 87-92, 2011.
- 22) 石井孝司, 脇田隆字: 海外における A 型肝炎集団発生 -わが国への警鐘- 化学療法の領域 印刷中
- 23) 石井孝司: 2010 年春季の A 型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析 消化器内科 54: 233-238, 2012.
- 24) 石井孝司: B 型肝炎の現状とワクチン 愛知県小児科医会会報 94: 38-46, 2011.
- 25) 石井孝司, 清原知子: A 型肝炎の血清保有状況と最近の流行状況 小児科 52: 1819-1825, 2011.
- 26) 道免和文, 小野原伸也, 田中博文, 春野政虎, 下田慎治, 姜 貞憲, 石井孝司, 高橋和明: 2010 年 A 型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討-1999 年ボルネオ (カリマンタン) 島由来株との近縁性 肝臓 52: 497-502, 2011.
- 27) 石井孝司: A 型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴 日本臨床 69:559-565, 2011.
- 28) 李 天成: 我が国における E 型肝炎の疫学と最近の動向 日本臨床 69:573-578, 2011.
- 29) 石井孝司, 李 天成: E 型肝炎 公衆衛生 75: 43-46, 2011.
3. その他
- 1) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report, 2011.
- 2) 清水博之: 「ポリオワクチン」「予防接種」の項を担当, 免疫の事典, 282-283, 425, 朝倉書店, 2011.
- II. 学会発表
1. 国際学会
- 1) Oka T, Hansman GS, Murakami K, Wakita T, Katayama K, SaV study group of Japan: Human sapovirus classification scheme based on pairwise distance analysis of entire capsid nucleotide sequences. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 2) Harada S, Nishimura K, Okada M, Katayama K, Oka T: Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of Sapovirus strains between 2002 and 2010 in Kumamoto prefecture, Japan. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 3) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Kanda T, Sato H: Structural features for the substrate recognition by sapovirus 3C-like protease. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 4) Motomura K, Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, Norovirus Surveillance Group of Japan: Structural dynamics of norovirus GII/4 genome in nature. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 5) Murakami K, Oka T, Todaka R, Wakita T, Matsuda T, Katayama K: Microscopic analysis of human norovirus-like particles bound to Caco-2 cells. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 6) Hayasaka D, Fujii Y, Nagata N, Duc DT, Takamatsu Y, Kitaura K, Tanaka K, Sata T, Suzuki R, Morita K: Multiple mechanisms of severe disease following Japanese encephalitis virus infection. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 7) Lim CK, Ami Y, Fujii Y, Moi ML, Kitaura K, Kotaki A, Morikawa S, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T: Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 8) Higo-Moriguchi K, Horikoshi-Shirato H, Someya Y, Okuno Y, Kurosawa Y, Taniguchi K: Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies against human noroviruses. IUMS2011 Sapporo, XV

- International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 9) Someya Y, Shirato H, Kumagai A, Ito H, Furukawa S, Wakita T, Ishii K, Narimatsu H, Kubota T: Structural basis for recognition of Lewis a antigen by Norovirus. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 10) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H: Phosphatidylinositol 4-kinase iii beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliiovirus activity. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 11) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Analysis of amino acid determinants of enterovirus 71 responsible for the PSGL-1-binding phenotype. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 12) Mistry N, Inoue H, Jamshidi F, Storm R, Nishimura Y, Shimizu H, Koike S, Arnberg N: Coxsackievirus A24 variant uses O-Linked glycoconjugates with terminal sialic acid as cellular receptors on human ocular cells. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 13) Asif N, Hosomi T, Nishimura Y, Alam MM, Oka T, Zaidi S, Shimizu H: Comprehensive full length sequence analysis of saffold viruses: Reevaluating classification. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 14) Iwai M, Yoshida H, Obara M, Horimoto E, Obuchi M, Kurata T, Takizawa T: Efficient elimination of polioviruses in sewage water after activated sludge process, evaluated by cell culture and newly developed real time PCR. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 15) Watanabe N, Murayama M, Date T, Kato T, Aizaki H, Wakita T: Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 16) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T: Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 17) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T: Huh-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 18) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita K, Aizaki H: Identification of host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 19) K. Watashi, N. Uchida, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Wakita: Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 20) Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Sekizuka T, Kuroda M, Wakita T: Characterization of HCV viral population by using multiple sequencing technologies. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 21) Matsumoto Y, Watashi K, Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H: Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 22) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Ami Y, Suzaki Y, Kataoka M, Takeda N, Wakita T: Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Rat Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses cell culture. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.

- 23) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Wakita T, Shimada T, Nakamura N, Tada Y, Noda M: Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 24) Noda M, Tada Y, Uema M, Nakashima K, Shimada T, Nakamura N, Kiyohara T, Ishii K: Food hygienic investigation on hepatitis A cases in the spring of 2010, Japan. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 25) Akari H, Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee YJ, Saito A: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 26) Uema M, Aoki N, Aoki S, Furuya Y, Nishio O, Shibata S, Kodaira A, Ishii K, Noda M: Role of imported seafood as a vehicle of hepatitis A viruses. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 27) T Shimoike, H Takagi, T Oka, K Murakami, T Wakita, K Katayama: Visualization of murine Norovirus replication complex in RAW264.7 cells. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 28) T Shimoike, K Nojima, T Wakita, Y Okada: Evaluation of HCV-inactivation in blood products. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 29) H Aizaki, Y Matsumoto, K Goto, K Watashi, R Suzuki, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, K Motojima, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011.9.11-16.
- 30) Yoshida H: Environmental surveillance and polio eradication, Hosted by Shandong CDC. Jinan, China, 2012.3.26.
- 31) Shimizu H: Poliovirus Vaccines; Current Status in Japan. The 5th International Vaccinology Workshop in Japan 2012, Tokyo, 2012.2.19.
- 32) Shimizu H: Hand, foot, and mouth disease outbreaks in the Asia-Pacific region. Pasteur Institute in Ho Chi Minh City 120 Years for Control and Prevention of Communicable Diseases, Ho Chi Minh City, 2011.11.17.
- 33) Shimizu H: PSGL-1-dependent and -independent replication of enterovirus 71. The 1st International Symposium of Vaccine Development against Human Hand-Foot-and-Mouth Diseases, ZhuNan, Taiwan. 2011.9.4.
- 34) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T: Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 35) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Wakita T, Kato T: Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 36) Moriyama M, Yokokawa H, Akazawa D, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Kato T, Ishii K, Wakita T: Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 37) Yokokawa H, Akazawa D, Moriyama M, Nakamura N, Kato T, Ishii T, Wakita T: Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA,

- 2011.9.8-12.
- 38) Aizaki H, Matsumoto Y, Goto K, Watashi K, Suzuki R, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Motojima K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 39) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T: Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 40) Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Sekizuka T, Kuroda M, Wakita T: Discovery of full-length HCV genome quasispecies by deep sequencing. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 41) Goto K, Kimura T, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Miyamura T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H: Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 42) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T: Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 43) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H: Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 44) Watanabe N, Futai K, Suga H, Wakita T: E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 45) K. Watashi, H. Sahara, K. Morohashi, K. Iwabata, T. Sunoki, K. Kuramochi, K. Takakusagi, H. Miyashita, N. Sato, A. Tanabe, K. Shimotohno, S. Kobayashi, K. Sakaguchi, F. Sugawara: Identification of a novel cellular RNA helicase-like protein as a target for cyclosporin A that is involved in hepatitis C virus genome replication. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 46) Takebe Y, Uenishi R, Tani H, Suzuki R, Takagi M, Hase S, Liao H, Tsuchiura T, Shinya K, Wakita T, Matsuura Y, Patel A: Small molecules that elicit strong anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptor. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 47) Fukasawa M, Shirasago Y, Saito K, Murakami Y, Fukazawa H, Suzuki T, Suzuki R, Wakita T, Hanada K, Chiba J: Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 48) J Law, D Hockman, S Frey, R Khoshy, T Wakita, J Bukh, C Rice, M Houghton, Does a vaccine derived from a single HCV strain elicit broadly cross-neutralising antibodies in humans? 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 49) M Esumi, S Kikuta, H Yamaguchi, S Nakajima, M Ishibashi, T Wakita, Serum and trypsin inhibitors inhibit the early step of hepatitis C virus infection. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, USA, 2011.9.8-12.
- 50) Matsumura T, Kato T, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M: 25-hydroxy- vitamin

- D inhibits hepatitis C virus replication and production of the infectious viruses. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, USA 2011. 11. 4-8.
- 51) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T: Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus. International meeting of molecular biology of hepatitis B virus, Florida, USA, 2011.
- 52) Shimoike T, Takagi H, Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K: Sub-localization of Murine Norovirus proteins and its genome RNA: 51st Annual meeting of The American Society for Cell Biology, Denver, Colorado, USA, 2011. 12. 3-7.
- 53) Ishii K, Li TC, Yoshizaki S, Shiota T, Kato T, Takeda N, Wakita T: Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Taipei, Taiwan, 2012. 2. 16-19.
- 54) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Ami Y, Suzaki Y, Suzuki T, Takeda N, Wakita T: Expression of rat HEV virus capsid protein and generation of the virus-like particles. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver, Taipei, Taiwan, 2012. 2. 16-19.
- 55) Nakamura N, Shimada T, Tada N, Okabe N, Kiyohara T, Ishii K, Noda M: Diffuse outbreak of hepatitis A suspected by national case based surveillance in Japan, 2010. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2011), Vienna, Austria, 2011. 2. 4-7.
- 56) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Shimada C, Nakamura N, Tada Y, Noda M, Wakita T: Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Bangkok, Thailand, 2011. 2. 17-20.
- 57) Li TC, Song S, Yang Q, Ishii K, Takeda N, Wakita T: The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, 2011. 2. 17-20.
- 58) T Wakita. Hepatitis C Virus Infection and Replication, annual meeting of Prof. Juei-Low Sung' s Research Foundation, Taipei, Taiwan, 2011. 8. 6.
- 59) T Wakita. HCV RNA replication and drug development. The 8th APASL Single Topic Conference Beijing, China, 2011. 10. 7.
- 60) T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development. Singapore-Japan Forum on Emerging Concepts in Microbiology, National University of Singapore, Singapore, 2011. 11. 15-16.
- 61) T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia. Siran Kaikan, Kyoto University. Kyoto, 2012. 1. 13.
- 62) T Wakita. Hepatitis C virus replication models and anti-viral development, The 1st International Symposium on Latent TGF-beta Activation Reaction. RIKEN Kobe Inst, Ctr. For Delop Biol, Auditorium, Kobe, 2012. 2. 25.
2. 国内学会
- 1) 村上耕介, 岡智一郎, 下池貴志, 脇田隆宇, 松田 幹, 片山和彦: Immunofluorescence microscopic analysis of human norovirus VLP bound to differentiated Caco-2 cells. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都, 2012. 3. 23-25.
- 2) 岡智一郎: サボウウイルスの分子系統解析. 衛生微生物技術協議会, 第32回研究会, 2012. 6. 30.
- 3) 藤井克樹: ロタウイルスの新知見. ウイルス性下痢症研究会, 札幌, 2011. 9. 10.
- 4) 村上耕介: カリシウイルスの新知見. ウイルス性下痢症研究会, 札幌, 2011. 9. 10.
- 5) 片山和彦, 藤井克樹: ロタウイルス感染症について.

- 希少感染症診断技術研修会, 東京, 2012. 2. 22.
- 6) 白土東子: カリシウイルスと血液型抗原. 第 153 回日本獣医学会学術集会, 2012. 3.
- 7) 宗村徹也, 藤本嗣人, 吉田 弘, 清水博之, 岡部信彦: SupraMap により作成したエンテロウイルス 71 時空系統樹の解析. 日本感染症学会, 山形, 2011. 10.
- 8) 岡上 晃, 野島康弘, 菊野理津子, 嶋崎典子, 吉田 弘, 篠原克明: 浮遊微生物に対するバイオハザード対策用防護服素材の防護性能評価に関する研究. 第 38 回日本防菌防黴学会(大阪) 2012. 8. 30-31.
- 9) 片岡周子, 要祐喜, 田鍬修平, 阿部隆之, 福原崇介, 谷英樹, 森石恆司, 松浦善治: Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 13-16.
- 10) 川西祐一, Raj Gurung, 山田明德, 片岡周子, 松浦善治, 中島裕美子, 前川秀彰: バキュロウイルスを用いたカイコゲノムへのトランスポゾン転移実験系の構築. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 13-16.
- 11) 坂田幸太郎, 原 詳子, 鈴木哲朗, 渡邊則幸, 相崎英樹, 高谷大輔, 松本武久, 井本正哉, 脇田隆字, 小嶋聡一: HCV NS3 Protease Mimics TGF- β 2 and Activates TGF- β Signals via Type I Receptor. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 13-16.
- 12) 脇田隆字: 新型シーケンサで展開するウイルスゲノム研究. ランチョンセミナー, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 14.
- 13) 横川 寛, 森山正樹, 赤澤大輔, 中村紀子, 加藤孝宣, 石井孝司, 脇田隆字: クロマトグラフィー法を用いた C 型肝炎ウイルス粒子の精製法の構築. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 13-16.
- 14) 姫田敏樹, 細見卓司, Naem Asif, 清水博之, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス) 感染性クローンの作製. 第 15 回日本神経ウイルス研究会. 金沢市, 2011. 5.
- 15) 加藤孝宣, 村山麻子, 政木隆博, 相崎英樹, 脇田隆字: 国内献血検体を用いた C 型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011. 6.
- 16) 武田 緑, 池田正徳, 有海康雄, 脇田隆字, 加藤宜之: 2 種類のヒト肝細胞株を用いた HCV 感染レポーターアッセイ系の開発. 第 47 回 日本肝臓学会総会, 東京, 2011. 6.
- 17) 相崎英樹, 多田有希, 松本善弘, 後藤耕司, 渡土幸一, 鈴木亮介, 田中純子, 鈴木哲朗, 岡部信彦, 脇田隆字: 1999 年から 2009 年における日本の C 型肝炎の発生状況. 第 47 回 日本肝臓学会総会, 東京, 2011. 6.
- 18) 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字: HCV 感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析. 第 47 回 日本肝臓学会総会, 東京, 2011. 6.
- 19) 松浦知和, 丸島秀樹, 前橋はるか, 大川 清, 松本善弘, 永妻啓介, 田中 賢, 高木一郎, 石井雄二, 斎藤勝也, 政木隆博, 相崎英樹: ヒト肝細胞癌細胞の 3 次元培養系は“肝癌モデル”なのか, “肝臓モデル”なのか? -glucose 代謝からの検討-, 第 47 回 日本肝臓学会総会, 東京, 2011. 6.
- 20) 石井孝司, 清原知子, 島田智恵, 中村奈緒美, 多田有希, 野田 衛, 脇田隆字: 2010 年春季の A 型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析. 第 47 回 日本肝臓学会総会, 東京, 2011. 6.
- 21) 加藤孝宣, 政木隆博, 脇田隆字: HCV JFH-1 キメラ株を用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. シンポジウム 10: C 型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開. 第 15 回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011. 10.
- 22) 松村卓哉, 加藤孝宣, 井廻道夫: Vitamin D とその代謝産物の抗 HCV 作用の検討. シンポジウム 10: C 型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開. 第 15 回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011. 10.
- 23) 加藤孝宣, 椎名正明, 脇田隆字: HCV JFH-1 株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析. パネルディスカッション 4: 肝疾患動物モデルと Translational Research. 第 15 回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011. 10.
- 24) 村山麻子, 三代俊治, 脇田隆字, 加藤孝宣: C 型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良い HuH-7 細胞サブクローンの分離と同定. 第 15 回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011. 10.
- 25) 渡土幸一: 数理モデルと肝炎ウイルス解析. 第 8 回生物数学の理論とその応用, 京都, 2011.

- 26) 坂田幸太郎, 原詳子, 鈴木哲朗, 渡邊則幸, 相崎英樹, 高谷大輔, 松本武久, 井本正哉, 脇田隆字, 小嶋聡一: C型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- β I 型受容体を介した TGF- β シグナルの活性化. 第 25 回肝臓洞壁細胞研究会, 東京, 2011.
- 27) 相崎英樹: C型肝炎ウイルス研究の進歩と展望. 第 58 回日本感染症学会総会・学術講演会・教育講演, 東京, 2011.
- 28) 道免和文, 田中博文, 春野政虎, 姜 貞憲, 石井孝司, 高橋和明: 2010 年 A 型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討- 1999 年ボルネオ (カリマンタン) 島由来株との近縁性. 第 39 回日本肝臓学会西部会, 岡山, 2011. 12.
- 29) 李 天成, 高橋和明, 片岡紀代, 吉崎佐矢香, 網 康至, 須崎百合子, 石井孝司, 脇田隆字, 三代俊治: Genotype 5 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析. 第 152 回日本獣医学会学術集会, 堺, 2011. 9.
- 30) 田中聖一, 山本 博, 万年和明, 李 天成: ニッポンザルにおける E 型肝炎ウイルス感染状況. 第 152 回日本獣医学会学術集会, 堺, 2011. 9.
- 31) 上間 匡, 石井孝司, 小原真弓, 田中俊光, 増本久人, 入谷展弘, 斎藤哲也, 吉田徹也, 山下育孝, 柴田伸一郎, 田中智之, 内野清子, 野田 衛: A 型肝炎ウイルス検出 PCR の高感度化の検証. 第 32 回日本食品微生物学会, 東京, 2011. 10.
- 32) 野田 衛, 多田有希, 田中智之, 石井孝司: 2010 年の A 型肝炎の分子疫学と食品衛生上の原因究明. 第 32 回日本食品微生物学会, 東京, 2011. 10.
- 33) 山下育孝, 青木紀子, 青木里美, 土井光徳, 古屋由美子, 西尾 治, 石井孝司, 野田 衛: A 型肝炎の国内発生における輸入生鮮魚介類の関与. 第 32 回日本食品微生物学会, 東京, 2011. 10.
- 34) 西村浩一, 原田誠也, 李 天成, 石井孝司, 田中智之, 野田 衛: 熊本県におけるイノシシ, ブタ及びシカの E 型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査. 第 32 回日本食品微生物学会, 東京, 2011. 10.
3. その他
- 1) 村上耕介: ノロウイルスはどんなウイルス?. 第 13 回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 静岡県立大学, 2012. 3. 17.
- 2) 西村順裕: 手足口病をおこすエンテロウイルスの感染機構. 日本ウイルス学会北海道支部 第 45 回夏季シンポジウム, 登別, 2011. 7. 23-4.
- 3) 西村順裕: ヒトにおける“口蹄疫!?” 手足口病研究の最前線. 山口大学農学部附属中高温微生物研究センター病原微生物部門シンポジウム, 山口, 2012. 3. 2.
- 4) 清水博之: ポリオ流行のリスクとポリオワクチン. 第 41 回国立感染症研究所安全連絡協議会, 東京, 2012. 3. 6.
- 5) 清水博之: ポリオ根絶とポリオワクチン. 感染研市民セミナー, 東京, 2012. 2. 25.
- 6) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオの疫学. 第 21 回トラベラーズワクチンフォーラム研修会, 東京, 2012. 2. 18.
- 7) 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入と移行期対策. 第 15 回日本ワクチン学会学術集会. 東京, 2011. 12. 11.
- 8) 清水博之: 不活化ポリオワクチン. 平成 23 年度感染症危機管理研修会, 東京, 2011. 10. 13.
- 9) 清水博之: エンテロウイルス感染症の現状とポリオワクチンについて. 愛知県小児科医会, 弥富市, 2011. 9. 25.
- 10) 清水博之: アジア地域におけるエンテロウイルス 71 感染症の流行. 第 52 回日本臨床ウイルス学会, 津市, 2011. 6.
- 11) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画の現状とポリオワクチンについて. 栃木県小児科医会 学術講演会, 宇都宮市, 2011. 5. 14.
- 12) 加藤孝宣: 培養細胞感染増殖系を用いた HCV ライフサイクルの評価とその応用. 大阪大学大学院消化器内科学セミナー, 大阪, 2011. 11. 28.
- 13) 渡士幸一: 低分子化合物を利用した肝炎ウイルス学解析. 感染・免疫・炎症・発癌, 札幌, 2011.
- 14) 渡士幸一: 低分子化合物を利用した肝炎ウイルス学解析. 東京大学医科学研究所第一回感染症国際研究センターシンポジウム, 東京, 2012.

- 15) 片山和彦、藤井克樹：ロタウイルス感染症について，希少感染症診断技術研修会，東京，2012. 2. 22.